ACADEMIE de PARIS
UNIVERSITE RENE DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE
NECKER ENFANTS-MALADES

ANNEE 1972

THESE

N° 97

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jacqueline ROSKIS née CHARBIT
le 24 mai 1947 à SIDI-BEL-ABBES (Algérie)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE. . . . . .

LES PLAQUETTES SANGUINES – BIOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE APPLICATION A L'ETUDE DE LA THROMBOPENIE DANS LE SYNDROME DE WISCOTT–ALDRICH

Président : M. P. MOZZICONACCI, Professeur

EDITIONS MEDICALES Em ET UNIVERSITAIRES
40, rue Pascal - PARIS XIIIe

ACADEMIE de PARIS
UNIVERSITE RENE DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE
NECKER ENFANTS-MALADES

ANNEE 1972

THESE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jacqueline ROSKIS née CHARBIT

le 24 mai 1947 à SIDI-BEL-ABBES (Algérie)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE. . . . . .

LES PLAQUETTES SANGUINES – BIOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE APPLICATION A L'ETUDE DE LA THROMBOPENIE DANS LE SYNDROME DE WISCOTT–ALDRICH

Président : M. P. MOZZICONACCI, Professeur

EDITIONS MEDICALES ET UNIVERSITAIRES

40, rue Pascal - PARIS XIIIe

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur Pierre MOZZICONACCI

Qui m'a fait l'honneur de bien vouloir accepter la présidence de cette thèse.

A Monsieur leDocteur PHAM HUU TRUNG

Ancien Chef de Clinique de Pédiatrie à la Faculté.

Dont les travaux et les précieux conseils ont permis la naissance puis la rédaction de cette étude.

A Monsieur le Docteur Claude GRISCELLI

Chef de Clinique Assistant de Pédiatrie à la Faculté.

Qui a si aimablement mis à ma disposition toute la matière des observations rapportées dans ce travail.

A mon Père

A ma Mère

A mon Père

A ma Mère

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION. -

PREMIERE PARTIE. -

Ultrastructure et fonctions des plaquettes normales.

L'Ultrastructure des plaquettes

Les fonctions plaquettaires

- L'hémostase primaire
  - Le clou hémostatique
  - Adhésion des plaquettes et agrégation à l'A. D. P.
  - Action de la thrombine
  - Rôle du système intrinsèque de la coagulation dans l'hémostase primaire.
- La coagulation
  - Propriétés coagulantes des plaquettes et schéma de la coagulation
  - facteur 3 plaquettaire
  - plaquettes et système extrinsèque de la coagulation.

L'Agrégation plaquettaire

- Agrégation à l'A. D. P.
- Agrégation par la thrombine
- Agrégation par le collagène
- Modifications morphologiques des plaquettes induites par les agents agrégants

- Autres agents agrégants - Mesure de l'activité plaquettaire
- Agrégation à l'adrénaline
- Inhibiteurs de l'Agrégation.

L'adhésivité plaquettaire

Le métabolisme plaquettaire

- Métabolisme glucidique
  - Source d'A. D. P.
  - Glycogène
  - Influences.
- Les protéines plaquettaires
- Le métabolisme lipidique
  - Phospholipides et coagulation
  - Acides gras
- La sérotonine plaquettaire
  - Rôle dans la coagulation
  - Métabolisme intra-plaquettaire.

DEUXIEME PARTIE. -

Le syndrome de Wiscott-Aldrich

Le déficit immunitaire dans le syndrome de Wiscott-Aldrich

- Définition
- Pathogénie
- Essais thérapeutiques.

La diathèse hémorragique dans le syndrome de Wiscott-Aldrich à propos de 3 cas.

- Observations
  - Description clinique
  - Investigations hématologiques simples.
- Exploration de la thrombopénie
- Etude des fonctions plaquettaires

- Ultrastructure des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich
- Conclusion
- Discussion des résultats de toutes les explorations pratiquées.

Le défaut primaire des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich, ou anomalies biologiques fondamentales.

Hypothèses :

- Défaut de production des plaquettes
- Défaut intra-corpusculaire.

Etude du métabolisme plaquettaire dans le syndrome de Wiscott-Aldrich

- les nucléotides plaquettaires
- le métabolisme glucidique
- conclusions des études expérimentales - défaut des régulateurs du cycle de Krebs.

La thrombopénie

- Origine intra-corpusculaire

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

o0o

INTRODUCTION

Ce travail comprend deux parties très distinctes :

La première est un exposé de nos connaissances actuelles sur le rôle des plaquettes dans l'hémostase, d'une part, et la Biologie de ces cellules sanguines, d'autre part, depuis leur ultrastructure jusqu'à leurs particularités métaboliques et fonctionnelles.

La seconde partie est consacrée à l'étude du déficit plaquettaire dans le syndrome de Wiscott-Aldrich qui est une maladie congénitale associant trois éléments :

- déficit immunitaire
- thrombopénie
- eczéma.

Pourquoi avoir traité dans le même mémoire de deux sujets distincts et avoir rapproché l'étude de la plaquette normale de celle d'un des aspects de sa pathologie ? C'est ce que nous voudrions expliquer dans cette introduction.

Nos connaissances en matière de Biologie plaquettaire sont encore purement descriptives surtout en ce qui concerne le fonctionnement de cette cellule, c'est-à-dire le "pourquoi et le comment" de ses propriétés dans la coagulation. Il manque une théorie biologique fondamentale qui expliquerait toutes les particularités et les propriétés observables, expérimentalement propres aux plaquettes. En l'absence donc d'une conclusion physiologique ou

biochimique de référence autre qu'une série de résultats expérimentaux, il nous paraît nécessaire, pour aborder un aspect de la pathologie plaquettaire et tenter une approche de la pathologie d'un déficit plaquettaire quantitatif, en l'occurrence le syndrome de Wiscott-Aldrich, de faire une étude comparative. L'application à la plaquette pathologique du même schéma de travail et des mêmes techniques que celles exposées dans l'étude de la plaquette normale, permettra d'analyser les anomalies rencontrées à la lumière de références biologiques fixes et d'en faire une description rationnelle qui ne sera pas seulement une énumération mais aussi une base de discussion.

D'autre part, dans ce domaine particulier de l'hématologie, les examens para-cliniques utilisés en médecine pratique sont directement inspirés et parfois identiques aux techniques de biologie fondamentale ; il est donc impossible d'interprêter les résultats pathologiques si on ne connaît pas les méthodes expérimentales employées et à chaque étape de l'étude l'explication ou au moins la réflexion du chercheur concernant le résultat normal.

En résumé, le but de ce travail est double : faire le point sommaire des acquisitions scientifiques dans le domaine des plaquettes sanguines et les appliquer à l'étude de la diathèse hémorragique d'origine plaquettaire du syndrome de Wiscott-Aldrich. Il est moins question pour nous de faire à partir des anomalies plaquettaires retrouvées dans cette maladie une étude statistique que de tenter de comprendre et de discuter les anomalies et si possible de les rattacher à un défaut primaire fondamental de la cellule, spécifique de ce syndrome.

o0o

- PREMIERE PARTIE -

ULTRASTRUCTURE DES PLAQUETTES SANGUINES

Reconnues et décrites dès la fin du XIXe siècle, l'étude des plaquettes a largement bénéficié des apports de la microscopie électronique en ce qui concerne leur morphologie et leur structure fine.

Les plaquettes circulantes sont des disques aplatis à l'intérieur desquels la microscopie électronique a permis d'identifier des structures spécifiques et ordonnées de manière déterminée ; certaines de ces structures sont facilement mises en évidence par des techniques standard, d'autres nécessitent des techniques particulières. Il paraît intéressant de comparer l'aspect des plaquettes en microscopie électronique selon la technique de fixation employée et selon les coupes étudiées.

Nous n'exposerons ici que deux procédés : a partir du sang citraté de sujets normaux on obtient un sang riche en plaquettes. La fixation se fait dans une solution Tampon Veronal acide acétique à Ph 7, 5 et à température du laboratoire. L'agent fixateur est dans le premier cas le tétroxyde d'Osmium à 1 % pour un volume de sang pendant trente minutes, et dans la seconde technique du glutaraldéhyde à 3 %. Dans ce second cas, le sang riche en plaquettes est ensuite traité trente minutes par le tétroxyde d'osmium. Après la fixation, le sang est centrifugé puis le culot est repris dans une solution de tyrode et plongé trente minutes dans un bain de tyrode ; il est enfin déshydraté par l'éthanol à concentrations croissantes.

Examinons d'abord l'ultrastructure des plaquettes fixées par le tétroxyde d'osmium, sur une coupe faite dans le plan du plus grand diamètre du disque plaquettaire. De forme ronde, il est entièrement limité par une membrane cellulaire continue qui apparaît comme une ligne simple de cent Angströms d'épaisseur ; il présente un cytoplasme finement granuleux, comportant les organites suivants :

- une mitochondrie possédant deux à trois crêtes, parfois quatre,
- des granulations de glycogène dispersées dans le cytoplasme,
- au centre, de nombreuses vésicules irrégulières et des structures tubulaires courtes qui sont les vacuoles : elles contiennent du dioxyde de silice, des particules de latex et des particules virales,
- des lysosomes ou granulations alpha, présents en très grand nombre : ils sont limités par une membrane et ont un contenu plus ou moins homogène dont l'opacité s'étend au-delà de la membrane limitante. Certains présentent à l'intérieur même de cette opacité homogène, des surfaces grossières granuleuses,
- des microtubules décrits par certains chercheurs, qui sont peu respectés par le fixateur employé.

La fixation au glutaraldéhyde a permis une étude plus fine de la membrane cellulaire et des organelles cytoplasmiques.

- Les caractéristiques de la membrane cellulaire sont étudiées sur une coupe perpendiculaire au plan du disque plaquettaire. Elle apparaît alors formée de deux bandes osmiophiles, figurant les deux couches protidiques, de part et d'autre d'une bande claire non osmiophile, la couche lipidique. Chaque bande a une épaisseur de vingt cinq Angströms et la membrane cytoplasmique a une épaisseur totale de soixante quinze Angströms. Cette membrane est entourée d'un manteau péri-plaquettaire extra-cellulaire : il s'étend en dehors de la membrane cellulaire simple telle qu'elle a été définie plus haut et se présente comme une couche finement granuleuse qui rayonne de la périphérie à partir de la portion externe de la membrane cellulaire. Ce manteau

péri-plaquettaire serait, selon Marcus, une partie intégrante de la membrane cytoplasmique. Il serait constitué de protéines absorbées du plasma, pour d'autres chercheurs.

- Les organelles intra-cytoplasmiques ont un aspect sensiblement différent que précédemment. Sur une coupe perpendiculaire au plan circulaire du disque plaquettaire on distingue :

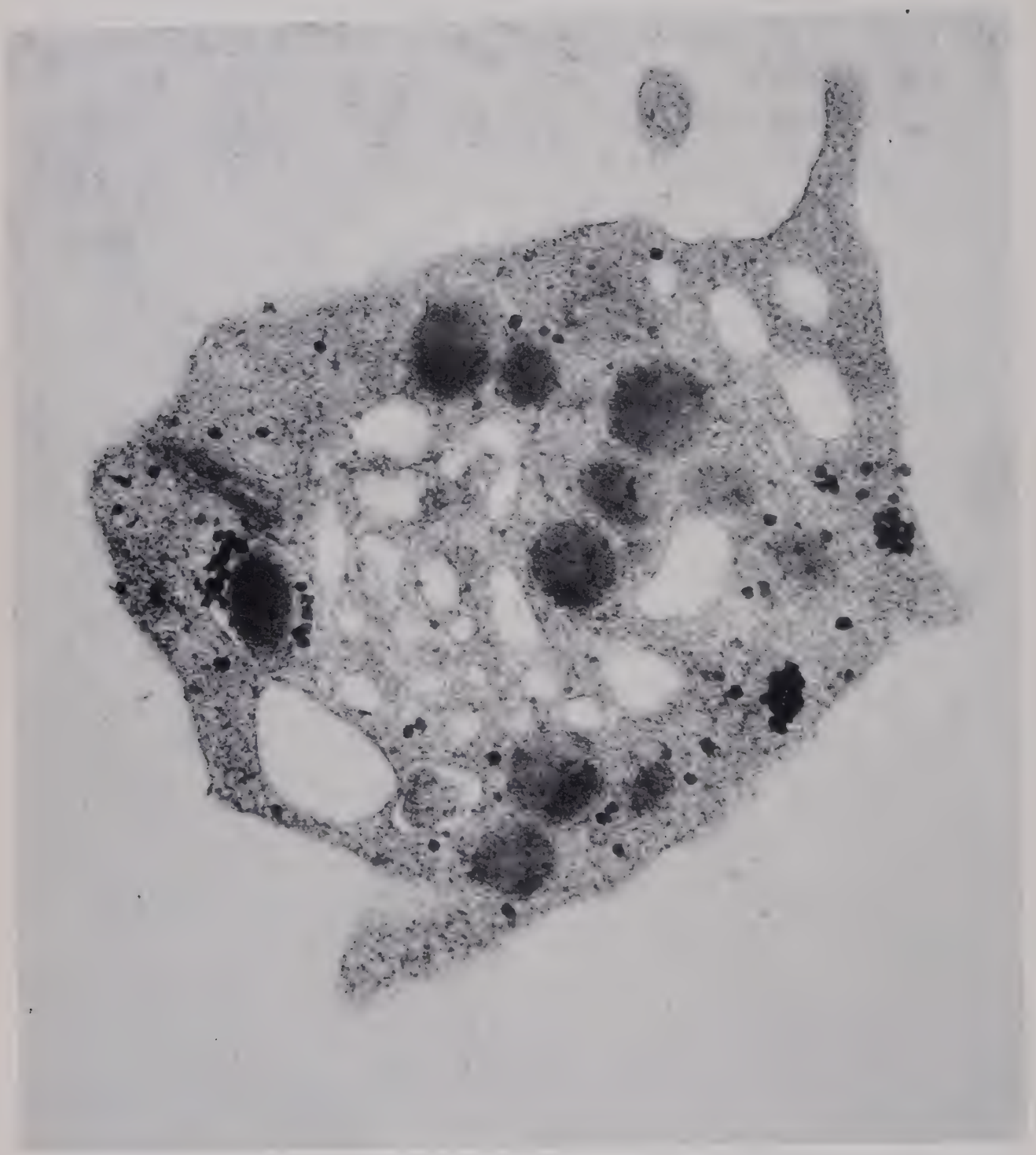
- plusieurs structures tubulaires allongées de diamètre inégal variant entre cent vingt cinq et quatre cent Angströms, placées au centre de la plaquette ; leur contenu est plus osmiophile que le contenu vacuolaire et ces tubes représentent probablement un système différent,

- des particules de glycogène soit dispersées comme précédemment dans le cytoplasme, soit au contraire groupées,

- des lysosomes de deux cents à trois cents millimicrons dans leur plus grande dimension. La fixation au glutaraldéhyde met bien en évidence leur membrane limitante ; elle est double et la membrane externe est séparée de la membrane interne par une zone de moindre osmiophilie. Chacune des deux membranes apparaît constituée comme la membrane cellulaire classique et présente la même morphologie que la membrane plaquettaire. En dedans de la membrane interne, le contenu du lysosome est plus ou moins homogène. Des petites surfaces d'osmiophilie accrue se détachent dans ce contenu mais ne se rencontrent pas constamment dans tous les lysosomes. Ceci suppose l'existence de deux ou de plusieurs populations de lysosomes plutôt que d'une seule,

- des microtubules nombreux apparaissant à la périphérie de la coupe ; leur lumière ronde a soixante cinq à cent Angströms de diamètre et ils sont entourés d'une membrane simple de cent à sept cents Angströms d'épaisseur qui ne se résume pas aux deux bandes osmiophiles séparées d'une bande claire, caractéristiques de la membrane cytoplasmique classique.

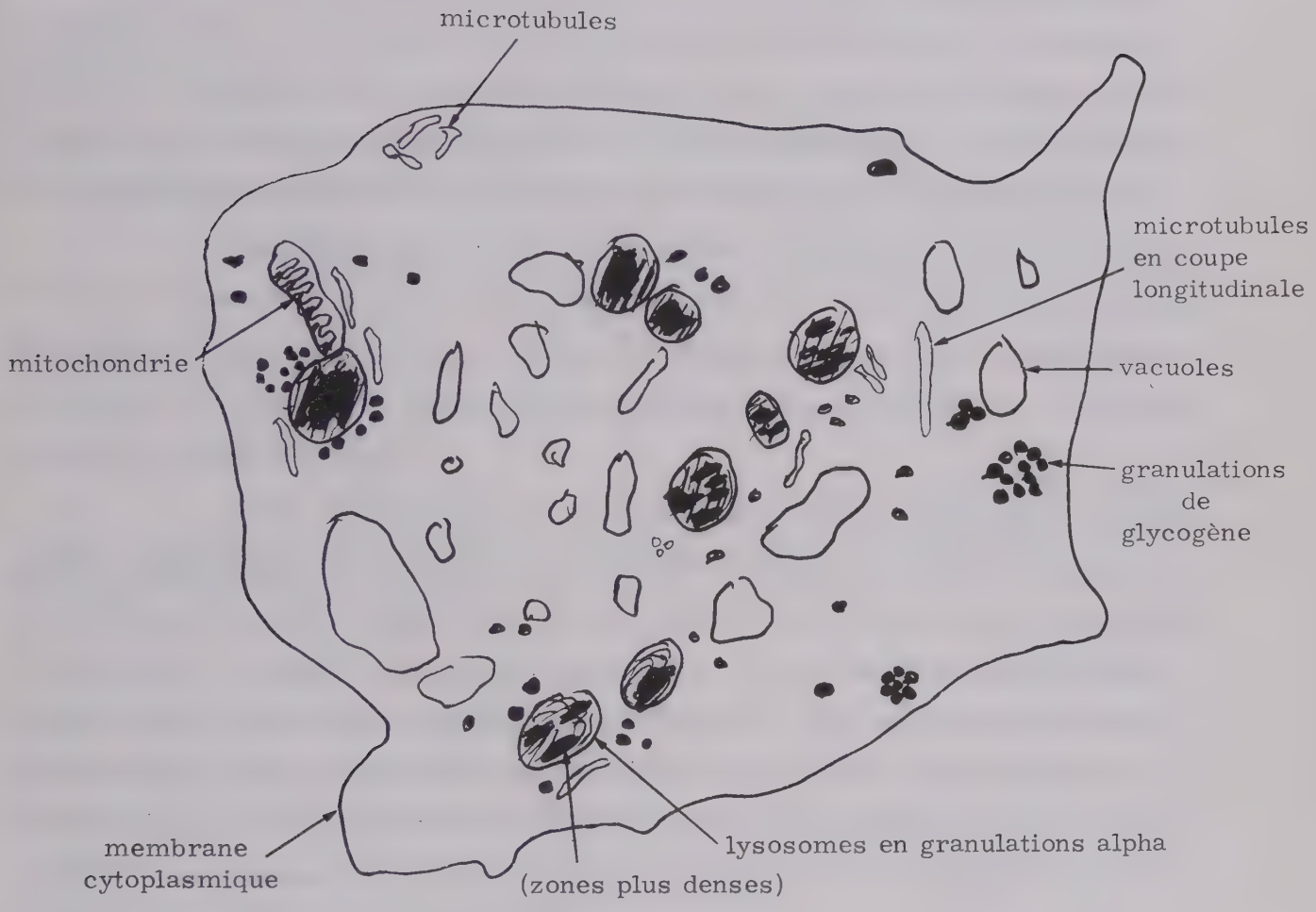
Sur une coupe de la plaquette dans un plan circulaire, les microtubules s'étendent à la périphérie du disque sur les trois quarts de la circonférence



Plaquette normale en microscopie électronique

Ultrastructure d'une plaquette normale

(Schéma)



plaquettaire. La découverte fréquente des microtubules en section transversale sur les coupes perpendiculaires au plan circulaire ou en section longitudinale sur les coupes parallèles au plan circulaire, suggère que les microtubules sont habituellement en rotation ou qu'ils se trouvent près de la périphérie du plan circulaire du disque plaquettaire ; quelquefois les microtubules sont orientés différemment dans la même plaquette. Ainsi, dans une même préparation, ils peuvent apparaître en section longitudinale en quelques points et en section transversale en un autre endroit. L'individualisation certaine de ces microtubules amène donc à deux conclusions : d'une part, leur existence en mouvement ou non dans la plaquette, et d'autre part, leur orientation notablement différente à l'intérieur de la même plaquette.

- des vacuoles qui sont connectées à la surface. Deux faits sont à noter à propos du système vacuolaire. D'une part, en périphérie les vacuoles sont en continuité avec la membrane cytoplasmique par leur membrane limitante. D'autre part, le matériel spécifique intra-vacuolaire est probablement en voie de digestion.

- enfin, la fixation au glutaraldéhyde a permis d'observer un organite particulier assez rare : il est allongé et parfois coudé de la forme d'un bâton de hockey. Chacun de ses côtés est bordé d'une membrane simple de quarante à soixante Angströms de largeur ; il contient des granulations rondes dont la disposition évoque une périodicité : la période est habituellement de trois cents Angströms et parfois de deux cents. Ceci évoque une communication de cette structure avec la membrane cytoplasmique. De tels organites sont rares dans les plaquettes circulantes et n'ont jamais été retrouvés dans celles qui sont agrégées.

En résumé, le disque plaquettaire tel qu'il apparaît en coupe en microscopie électronique, présente une membrane limitante qui est la membrane cellulaire classique avec ses deux couches protidiques séparées par une

couche lipidique et un cytoplasme granuleux qui contient une ou deux mitochondries, des granulations de glycogène nombreuses, de nombreux lysosomes ou granules alpha, et un système tubulaire microtubules périphériques et système vacuolaire.

o0o

LES FONCTIONS PLAQUETTAIRES

L'exposé des fonctions des plaquettes sanguines (1) comprendra la description du rôle qu'elles jouent aux deux stades de l'hémostase, hémostase primaire et coagulation et une analyse biologique de ces fonctions, à savoir leur mécanisme biochimique et leur support métabolique ou structural.

L'hémostase primaire

- Elle répond à une série complexe de phénomènes biologiques qui se déroulent immédiatement après une blessure ou un dommage vasculaire. Elle recouvre les deux premiers temps de la coagulation classique : Temps vasculaire et Temps plaquettaire.

Le premier temps consiste en un rapprochement des deux berges vasculaires lésées ou sectionnées. Cette vaso-constriction locale et brève est insuffisante à elle seule pour arrêter l'hémorragie mais elle prépare et favorise le temps plaquettaire : En effet, en l'espace de quelques secondes des plaquettes adhèrent à la zone traumatisée ; un grand nombre de plaquettes venant de la circulation générale viennent bientôt se coller à ce dépôt initial par agrégation réciproque des plaquettes entre elles. Ainsi la lumière du vaisseau est progressivement obturée par une masse de plaquettes : c'est le clou plaquettaire ou clou hémostatique. Le clou plaquettaire est d'abord perméable à de petites quantités de sang puis il devient imperméable, obstruant ainsi l'orifice vasculaire ; il est dit alors consolidé.

Cependant, le processus de la coagulation proprement dite commence de s'activer : activation du système intrinsèque, le collagène activant le Facteur XII, et activation du système extrinsèque par un facteur tissulaire libéré par les hématies et les cellules endothéliales lésées. Des traces de thrombine et un petit dépôt de fibrine sont ainsi formées et peuvent être mis en évidence dans l'atmosphère péri-plaquettaire pendant ce temps plaquettaire (1). Cependant la coagulation n'intervient pratiquement pas à ce stade ; l'hémostase primaire, vaso-constriction, adhésion puis agrégation plaquettaire, est en effet normale dans les coagulopathies.

La formation spontanée du clou plaquettaire nécessite donc l'existence d'un dommage vasculaire, de plaquettes sanguines et des facteurs plasmatiques de la coagulation (2, 3). L'ensemble de ces phénomènes est rapide et se déroule en une à deux minutes.

Nous allons voir maintenant les caractéristiques de l'hémostase primaire telles qu'elles ont pu être déduites des expériences de laboratoire.

- Adhésion des plaquettes et réaction de libération.

Tout d'abord il a été mis en évidence par les techniques de microscopie électronique in vivo (4, 5, 6) que les premières plaquettes déposées n'adhéraient pas aux cellules endothéliales lésées mais aux fibres collagènes du tissu de soutien de l'endothélium vasculaire, mises à nu par le traumatisme vasculaire (5, 7, 8). L'adhésion des plaquettes au collagène a pour résultat d'importants remaniements morphologiques et biochimiques des plaquettes, comparables à ceux provoqués par la mise en présence expérimentale de plaquettes et de fibres conjonctives ou de collagène purifié. Ces altérations consistent en une dégranulation intra-plaquettaire (7, 9) alors que de l'A. D. P., de la sérotonine et d'autres composants plaquettaires apparaissent dans le milieu avoisinant : c'est la réaction de libération ou "release". Ces modifications biochimiques accompagnant la dégranulation, il est probable que les produits libérés soient contenus dans les granulations plaquettaires (10).

- Action de la thrombine

L'apparition dans l'atmosphère péri-plaquettaire de la thrombine formée en quantités infinies dès le temps plaquettaire par activation de la coagulation par le collagène, a deux conséquences.

- Elle entraîne la consolidation du clou plaquettaire : l'agrégat se contracte dans son ensemble, probablement sous l'effet d'un enzyme contractile, la thrombosténine (2), et devient imperméable. Les plaquettes arrivant par la circulation générale sont alors rapidement captées dans le clou plaquettaire et vidées de leurs granulations en présence de thrombine. Outre ces altérations morphologiques, l'apparition de traces de thrombine entraîne également la libération spécifique de constituants métaboliques de la plaquette tels que acides aminés, amines, potassium, nucléotides. L'ensemble de ces phénomènes plaquettaires en rapport avec la présence de thrombine, est appelée "Métamorphose visqueuse" (11, 12). Celle-ci va jouer un rôle majeur dans la coagulation.

Les derniers stades de la réaction thrombine plaquettes deviennent non spécifiques et représentent la transition entre deux états de la membrane plaquettaire qui, de barrière cellulaire active, devient limite cellulaire non sélective.

- Le deuxième effet de la thrombine s'observe sur son substrat spécifique, le fibrinogène plasmatique qui est transformé dès ce stade en fibrine ; des fibres microscopiques de fibrine sont en effet décelables en pourtour du clou plaquettaire dont elles deviennent au cours de la coagulation, les principaux constituants (8). En l'espace de quelques heures ou jours, presque toutes les plaquettes du clou hémostatique sont remplacées par la fibrine. Dans les derniers stades, le clou hémostatique est envahi par des cellules mononucléées qui paraissent phagocyter les plaquettes et la fibrine. De plus, il a été montré que les granulations plaquettaires renferment une Cathepsine A spécifique, enzyme qui possède une activité protéolytique potentielle ; elle pourrait être à l'origine de la dissolution du clou plaquettaire (13).

- L'intéraction plaquettes-collagène

au cours de l'hémostase primaire, répond à un phénomène biochimique spécifique démontré par les expériences de nombreux chercheurs (14). Si on transforme la structure de la molécule de collagène naturel par traitement à la collagénase, la propriété d'agrégation des plaquettes est perdue. Quatre vingt dix pour cent de l'activité d'agrégation plaquettaire du collagène disparaît si les groupements aminés libres de sa molécule sont bloqués chimiquement.

Mais cette activité est inchangée si on ajoute au collagène des protéines chargées positivement ou si on détache par la pepsine les télopeptides chargés négativement. Enfin, le rôle des groupements carboxyles libres du collagène est nul dans l'adhésion plaquettaire mais joue un rôle dans l'activation du facteur Hageman. Ainsi, les groupements aminés libres du collagène apparaissent seuls nécessaires à l'adhésion plaquettaire et donc à la capacité d'agrégation plaquettaire du collagène. Ceci suggère que cette adhésion puisse être un phénomène électrostatique : adhésion des charges positives des groupements aminés du collagène aux charges négatives des membranes plaquettaires.

- L'agrégation des plaquettes entre elles induite par le collagène après leur adhésion est sous la dépendance de l'A. D. P. provenant des plaquettes elles-mêmes au cours de la "libération" (14, 15). De l'A. D. P. est également libéré à partir des cellules lésées de l'endothélium vasculaire, et des globules rouges. Le mode d'action de l'A. D. P. reste encore inconnu. C'est également par l'intermédiaire de l'A. D. P. intra-plaquettaire que la thrombine induit l'agrégation des plaquettes (18). Ainsi, les antagonistes de l'A. D. P. interfèrent avec l'agrégation par la thrombine.

- Enfin, les réactions entre plaquettes et collagène ne nécessitent aucun co-facteur bien qu'on pense couramment que le frinogène et une autre protéine plasmatique au moins soient nécessaires à l'agrégation à l'A. D. P. (16, 17).

- L'intervention d'autres facteurs

au cours de l'hémostase primaire s'ajoute à un [illegible]

par traitement à la cortisone. La propriété d'agrégation des plaquettes est perdue. Guerro trouve dans pour cent de l'adénine [illegible] du collagène disparaît et les plaquettes, soumises à [illegible] sont bloquées ainsi.

vation de facteur Hageman. Ainsi, les granulomatoses malignes [illegible] cytes apparaissent aussi nécessaires à l'adhésion physiologique [illegible] carnosité d'agrégation provoquée par le collagène. Ceci [illegible] sation puisse être un phénomène thérapeutique : [illegible] tives des [illegible] humaines du collagène aux corps [illegible] humaine plaquettaire.

- L'agrégation des plaquettes [illegible] après leur adhésion est sous la dépendance de [illegible] quentes elles-mêmes au cours de la "libération" (ADP, [illegible] [illegible]

- Enfin, les réactions entre plaquettes et [illegible] protéine plasmatique [illegible] (15, 17).

- Rôle du système intrinsèque de la coagulation dans l'hémostase primaire

On a étudié (4) les modifications de l'hémostase primaire et plus particulièrement de l'agrégation à l'A. D. P., au collagène et à la thrombine chez des animaux rendus déficients en Facteurs VII et IX et en Facteur VIII. En cas de défaut de facteur IX ou de facteur VIII, on observe un arrêt du saignement, bref, suivi de quelques épisodes de resaignement dans les minutes qui viennent, alors que les plaquettes des mêmes animaux étudiées in vitro répondent normalement aux agents agrégants. Dans ces mêmes cas, le dépôt de fibrine est très pauvre.

Ceci permet de conclure que les premières réactions plaquettaires à une lésion vasculaire sont indépendantes de la coagulation, mais les quantités infimes de fibrine formées dès cet instant par la voie du système intrinsèque sont nécessaires à la formation d'un clou hémostatique stable et imperméable (14, 4).

La coagulation

Nous allons envisager maintenant le rôle des plaquettes dans la coagulation proprement dite.

- Le temps de coagulation d'un plasma déplaquetté est allongé ; l'addition de plaquettes au plasma le raccourcit au contraire. En fait, dans les tests de coagulation in vitro on peut utiliser à la place des plaquettes un mélange de phospholipides dont la quantité est établie avec soin ; cependant les lipoprotéines plaquettaires sont plus efficaces que des lipides, même si ceux-ci sont extraits des plaquettes. Les membranes cytoplasmiques des plaquettes sont les agents coagulants les plus puissants qu'on ait pu tester (10). Des substances capables de provoquer la coagulation du plasma ont été isolées à partir des hématies et d'autres tissus mais il est peu probable qu'elles jouent un rôle dans l'hémostase spontanée.

L'activité coagulante des plaquettes peut également être mise en évidence sur sang total non sédimenté (12, 19), mais elle se développe

après la formation de thrombine ou après incubation des plaquettes dans un milieu contenant de la thrombine.

Elle n'est alors pas spécifique car des cellules quelconques peuvent exercer une telle activité coagulante après exposition prolongée à la thrombine qui entraîne la libération d'une lipoprotéine à travers la membrane cytoplasmique passive et non sélective.

- Il est à noter que la microscopie électronique a montré que les membranes cytoplasmiques des plaquettes agrégées dans le clou plaquettaire étaient intactes. C'est sans doute à cette préservation de leur membrane qu'elles doivent leur rôle dans la coagulation, comme nous allons le voir.

- Schéma de la coagulation (1) :

(voir le schéma page 14 bis, suivante).

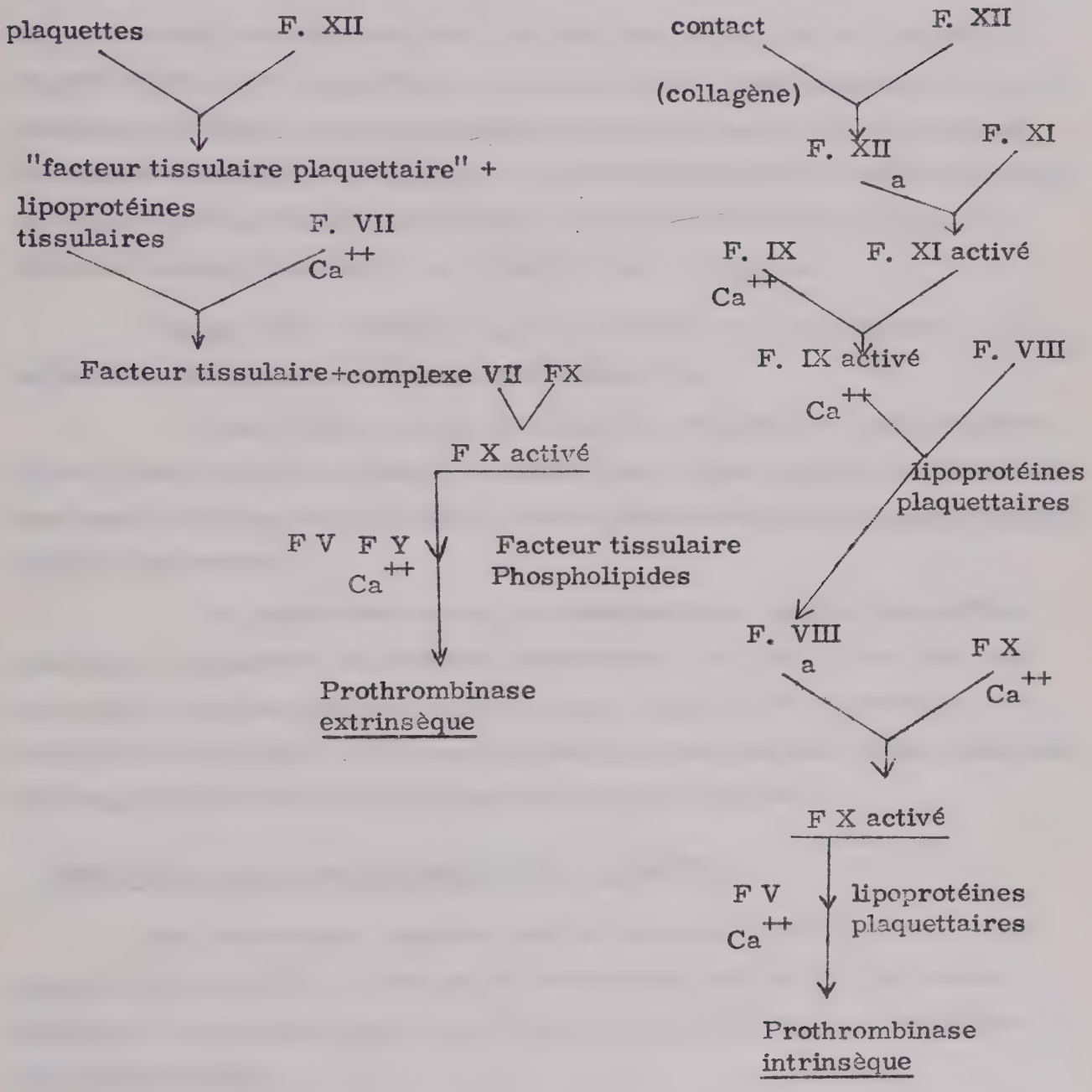
- Rôle des plaquettes dans l'activation du système intrinsèque de la coagulation : les lipoprotéines plaquettaires interviennent à deux stades de la formation de la prothrombinase par le système intrinsèque, en fournissant une surface de contact catalytique nécessaire à l'intéraction des facteurs plasmatiques. Cette fonction plaquettaire dans la coagulation est connue sous le nom de facteur 3 plaquettaire.

In vivo, cette activité se manifeste avant la formation de la thrombine et a probablement pour origine la membrane cytoplasmique des plaquettes agrégées dans le clou hémostatique.

En effet, in vitro l'activité du facteur 3 plaquettaire est décelable après agrégation par l'A. D. P. ou d'autres agents (9, 20) ; le terme de facteur 3 plaquettaire ne désigne pas une fonction plaquettaire unique, ni une entité biochimique isolable (1).

Il n'existe encore pas de test mesurant exactement le facteur 3 plaquettaire. Les tests couramment utilisés in vitro ont pour principe que l'activité du facteur 3 plaquettaire se manifeste par un raccourcissement du

- Schéma de la coagulation -



temps de coagulation comparé à un témoin. La technique la plus largement utilisée est le test de STYPVEN au venin de vipère RUSSELL. Celui-ci coagule le plasma en présence de lipoprotéines fournies par les plaquettes ; le temps de coagulation du plasma raccourcit quand les plaquettes sont incubées en présence d'une surface appropriée comme le kaolin, le raccourcissement est pris comme mesure du facteur 3 plaquettaire. De nombreux chercheurs ont pu montrer la corrélation entre les résultats anormaux de ces tests et les désordres de la coagulation, prouvant ainsi la validité des tests : il en est ainsi, par exemple, dans les dysglobulinémies et l'urémie, maladies dans lesquelles la membrane cellulaire de la plaquette est entourée d'une protéine anormale ou d'un facteur métabolique qui empêche l'intéraction des lipoprotéines plaquettaires avec les facteurs de la coagulation.

Pourtant deux difficultés se présentent dans l'interprétation des résultats des tests mesurant le facteur 3 plaquettaire :

- leur variation selon les techniques utilisées par chaque laboratoire, de sorte qu'il est difficile de savoir dans quelle mesure des résultats anormaux représentent un décalage par rapport aux valeurs normales appréciable cliniquement ;

- le rapport exact entre le désordre hémorragique et le défaut qualitatif ou quantitatif du facteur 3 plaquettaire. En effet, il est rare que le trouble de la coagulation reconnaisse pour seule cause une anomalie du facteur 3 plaquettaire, et, le plus souvent dans ces cas, des explications plus directes du désordre hémorragique peuvent être trouvées.

- Plaquettes et système extrinsèque de la coagulation

Des expériences montrent que les plaquettes sont capables, en présence de Facteur XII, de développer une certaine activité du type facteur tissulaire, qui les fait entrer dans le système extrinsèque de la formation de prothrombinase.

C'est HOUGIE (21) qui découvrit que des plaquettes exposées à une surface de verre sont capables de coaguler un plasma d'hémophile : dans ce

cas, le système intrinsèque étant déficient, la coagulation s'explique par la mise en jeu du système extrinsèque. BIGGS et ses collaborateurs ont invoqué l'existence d'une substance distincte du facteur 3 plaquettaire produite par les plaquettes. Ils ont montré qu'après incubation d'un plasma riche en plaquettes pendant trente six heures, les plaquettes activées accélèraient le temps de coagulation d'un plasma normal et d'un plasma déficient en facteur VIII, IX ou XI, et raccourciraient légèrement le temps de coagulation d'un plasma déficient en facteur V, VII ou X. Le développement de cette activité plaquettaire dépendrait de la présence de facteur XI ; aucun autre facteur n'est apparu intervenir. Le rôle de cette activité type facteur tissulaire des plaquettes, est probablement mineur dans la coagulation in vivo.

o0o

L'AGREGATION PLAQUETTAIRE

Après cette étude des activités coagulantes des plaquettes, qui ne représentent qu'un seul aspect de leur physiologie, nous sommes amenés à faire une revue plus générale du comportement de la plaquette en présence d'agents biologiques divers. Ceci nous permettra de mieux connaître la réactivité spécifique de cette cellule, par des méthodes expérimentales plus que par des conclusions théoriques.

L'agrégation à l'A. D. P.

C'est l'observation d'HELLEM (22) en 1960, qui a donné un grand développement à la recherche dans ce domaine. Après passage du sang à travers une colonne de billes de verre, le nombre des plaquettes était réduit de moitié. S'il utilisait du plasma riche en plaquettes à la place du sang total, il constatait que ce nombre restait inchangé ; les plaquettes avaient adhéré aux billes de verre et entre elles proportionnellement au nombre de globules rouges présents dans le prélèvement employé. Le matériel des globules rouges qui provoquait cette agrégation plaquettaire fut d'abord appelé Facteur R., puis identifié comme de l'A. D. P. (22).

Pour la majorité des chercheurs, l'agrégation des plaquettes entre elles, induite par l'A. D. P., est un phénomène biochimique qui sous-tend la formation du clou plaquettaire.

Il a déjà été vu que l'A. D. P. provient des plaquettes adhérentes au collagène, provoquant alors l'agrégation des plaquettes qui viennent s'ajouter

à ce premier dépôt. L'agrégation à l'A. D. P. est rapide et spécifique. Il semblerait que la membrane cytoplasmique des plaquettes contient des sites récepteurs à l'A. D. P. ; Born a proposé que l'A. D. P. exercerait son action en formant un complexe avec l'un des composants de la membrane plaquettaire (23). Mais il a été très clairement mis en évidence que l'agrégation à l'A. D. P. pouvait se produire sans liaison des plaquettes à l'A. D. P. (24, 25). Aucune théorie n'a en fait réussi à expliquer à elle seule le mode d'action de l'A. D. P.

- Une propriété importante de l'agrégation induite par l'A. D. P. est sa réversibilité (16, 26), dont on explique mal le mécanisme. On a d'abord pensé que l'accumulation des produits de dégradation de l'A. D. P., tels l'adénosine, en était responsable. Mais les plaquettes se désagrègent même si des quantités relativement importantes d'A. D. P. sont ajoutées dans le milieu (9, 27). L'enzyme adényl-kinase qui catalyse la dégradation de l'A. D. P. étant présent dans les plaquettes, les hématies et dans le plasma déplaquetté, on en a déduit que cet enzyme n'était pas engagé dans le catabolisme de l'A. D. P. aux concentrations auxquelles celui-ci provoque l'agrégation plaquettaire.

Notons aussi que l'agrégation plaquettaire nécessite la présence de calcium, de fibrinogène et d'une ou de plusieurs autres protéines plasmatiques.

- In vitro, l'agrégation plaquettaire en présence d'A. D. P. n'a lieu que si les plaquettes sont suffisamment rapprochées les unes des autres. Dans les tests d'agrégation à l'A. D. P., si l'A. D. P. est ajouté au plasma riche en plaquettes non agité, l'agrégation n'a pas lieu. Comme O'BRIEN (28) l'a observé, il en est de même si le plasma riche en plaquettes est agité une heure après l'exposition à l'A. D. P. A ce moment, l'addition d'A. D. P. supplémentaire au milieu ne réussit pas à agréger les plaquettes.

De cette expérience, on a pu conclure (1) que l'A. D. P. mis initialement à incuber avec le plasma non agité a induit un état "réfractaire" des plaquettes pendant cette période. Les recherches de Rozenberg et Holmsen (27) dans ce domaine les ont amenés à supposer qu'il existait toujours dans le

plasma une population de plaquettes réfractaires quand l'A. D. P. est ajouté au milieu en premier ; plus tard, cette population commence à répondre à l'agrégation alors qu'une autre population entre dans un stade réfractaire ; selon les mêmes auteurs, l'agrégation plaquettaire par l'A. D. P. et la réaction inverse représentent l'alternance de deux états des plaquettes, l'agrégation et le stade réfractaire, se succédant l'un à l'autre. L'état réfractaire pourrait être rattaché à la fonction d'une protéine plaquettaire contractile.

L'origine métabolique de l'A. D. P. plaquettaire a fait l'objet de nombreuses recherches. Il ne provient pas de l'A. T. P. comme l'hypothèse avait été soulevée. HOLMSEN (29) a montré que les plaquettes possèdaient deux pools de nucléotides adényliques : l'un participe au métabolisme cellulaire des nucléotides et demeure dans la plaquette. L'autre métaboliquement inerte est libéré lors de la réaction de libération induite par le collagène.

HASLAM (48) a montré que l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine dépend de la même manière de la libération d'A. D. P. préformé dans la plaquette elle-même.

L'agrégation par la thrombine et la métamorphose visqueuse

Contrairement à l'agrégation par l'A. D. P. , en présence de thrombine les plaquettes s'agrègent entre elles après un délai de 10 minutes et subissent alors des transformations morphologiques et des modifications biochimiques portant le nom de métamorphose visqueuse.

Ces phénomènes peuvent être suivis expérimentalement indépendamment de la coagulation du fibrinogène puisque la quantité de thrombine nécessaire à leur déroulement est moindre que celle requise pour polymériser le fibrinogène. Il s'agit, en effet, de réactions parfaitement distinctes.

Une des phases de la métamorphose visqueuse consiste en une réaction de libération au cours de laquelle certains composants plaquettaires apparaissent dans le liquide surnageant, parmi lesquels de l'A. D. P. intra-plaquettaire provenant du pool de nucléotides adényliques non employé dans le métabolisme cellulaire.

De plus A. D. P. et thrombine ont un effet synergique sur les plaquettes qui s'agrègent (20).

Des catécholamines apparaissent également dans le milieu qui semblent potentialiser la thrombine ou l'A. D. P. libéré sous son action (31, 32).

L'agrégation par le collagène

Comme la thrombine, le collagène induit après un délai l'agrégation plaquettaire et une réaction de libération accompagnées de modifications morphologiques : dégranulation et libération de métabolites tels l'A. D. P., sérotonine, Béta glycuronidase, catécholamines et facteur 4 plaquettaire.

Le collagène semble agir sur la phase initiale de l'agrégation alors que la thrombine agit tout au long de l'agrégation (1).

On a récemment montré une sélectivité de l'adhésion au collagène selon l'âge des plaquettes. Les plaquettes jeunes adhèrent au collagène plus vite en plus grand nombre que les plaquettes âgées tant in vivo qu'in vitro (33). Ceci n'est pas vérifié en ce qui concerne l'agrégation à l'A. D. P.

L'agrégation des plaquettes induites par l'A. D. P. ; le collagène, la thrombine et d'autres agents agrégants est immédiatement précédée de modifications de leur forme et de leur volume : de disques plats elles deviennent sphéroïdes et leur volume s'accroît en même temps de 15 % (34, 36). Les inhibiteurs de l'agrégation, aolénosine acide monoiodacétique. A. M. P., empêchent également ces changements morphologiques. L'E. D. T. A. au contraire inhibe l'agrégation plaquettaire mais reste sans effet sur ces modifications cellulaires. Enfin, les plaquettes de la thrombasthénie se transforment en sphères sous l'action de l'A. D. P. mais elles n'agrègent pas.

En même temps que ces réarrangements externes, les plaquettes subissent une réorganisation interne. Les microtubules se rangent à la périphérie et les mitochondries au centre.

Il est vraisemblable que ces altérations de forme et de volume qui accompagnent l'exposition à l'A. D. P. sont dues à une variation de la

perméabilité de la membrane cellulaire, qui entraîne une entrée d'eau et de sodium dans la plaquette (35).

Il est intéressant de noter que malgré ces transformations, l'agrégation à l'A. D. P. reste réversible. Le changement de forme est peut-être en rapport avec la réorganisation d'une lipoprotéine de surface qui prépare la membrane plaquettaire à son rôle dans la coagulation (1).

On notera que l'agrégation plaquettaire n'est pas induite exclusivement par les agents biologiques que nous venons de voir mais constitue également la réponse des plaquettes à une grande variété de substances biologiques ou non (35, 37, 38) qui peuvent être classées de la façon suivante : enzymes solubles tels que la trypsine ; composés aminés tels que la sérotonine ; médiateurs chimiques comme l'adrénaline ; enfin substances spécifiques ou semi-spécifiques tels : acides gras saturés à longue chaîne - particules de latex entourées de protéines - protéines plasmatiques dénaturées par la chaleur - complexes antigène-anticorps - cristaux d'acide urique, virus, bactéries et billes de verre.

L'A. D. P. est probablement le médiateur de l'agrégation plaquettaire commun à tous ces agents, mais cela n'a pu être démontré clairement dans chaque cas.

Dans le cas des complexes antigène-anticorps et des particules de latex, l'agrégation s'accompagne d'un phénomène de phagocytose par les plaquettes analogue à la phagocytose leucocytaire (38).

De manière générale, toutes ces réactions s'accompagnent de dégranulation plaquettaire et de "release". En outre, un composant plaquettaire qui accroît la perméabilité vasculaire est libéré dans le milieu à la suite de ces réactions (38).

Un mot des techniques qui permettent d'apprécier in vitro, de manière quantitative, l'agrégation plaquettaire en présence de différents agents : les méthodes utilisées consistent à mesurer par photométrie le temps d'apparition

et l'importance des agrégats dans un plasma riche en plaquettes agité continuellement. L'apparition des agrégats qui tombent au fond du tube entraîne un éclaircissement progressif du plasma, qu'on peut traduire par l'enregistrement continu ou discontinu des variations de densité optique. Cette méthode est largement répandue malgré ces inconvénients : variations des résultats obtenus avec des prélèvements pris à quelques jours d'intervalle.

L'agrégation des plaquettes par l'adrénaline

L'étude qui en a été faite par O'BRIEN a ouvert une nouvelle phase de la recherche de la biologie plaquettaire. La courbe d'enregistrement de l'agrégation des plaquettes en présence d'adrénaline comprend deux parties : d'abord une pente rapide, un palier, puis une seconde pente, qui traduisent les deux phases de l'agrégation plaquettaire en réponse à une dose unique d'adrénaline. La première vague d'agrégation est partielle, puis, après un temps de latence, survient une deuxième vague qui est complète. La même observation a été faite par MACMILLAN (42) avec l'A. D. P. De plus, sur 80 % des échantillons de plasma riche en plaquettes examinés en présence de concentrations critiques d'A. D. P. , il note que l'agrégation des plaquettes n'était plus suivie de la réaction inverse mais qu'une deuxième vague survenait qui devenait bientôt maximale et irréversible. Il démontra alors que de l'A. D. P. (42) était libéré des plaquettes pendant cette deuxième vague d'agrégation.

Cette réponse biphasique des plaquettes tant à l'A. D. P. qu'à l'adrénaline s'explique ainsi : la première vague d'agrégation est due à un effet direct des deux agents sur les plaquettes ; la seule différence entre leurs modes d'action étant que l'adrénaline agit sans changement de forme des plaquettes et qu'elle produit une première phase plus courte et spontanément irréversible. La deuxième vague irréversible pour les deux agents agrégants est due à l'A. D. P. intra-plaquettaire libéré alors. On peut, en effet, déceler en même temps dans le milieu près de 55 % de l'A. D. P. normalement contenu dans les plaquettes (43). Cette deuxième vague d'agrégation s'accompagne également du développement d'une activité facteur 3 plaquettaire.

Les drogues qui inhibent la deuxième vague d'agrégation par l'A. D. P. sont des stabilisateurs de la membrane cellulaire tels que la chlorpromazine ou l'Imipramine (43), qui sont incapables d'inhiber la première vague. Ces substances n'agissent pas sur la réaction A. D. P. -plaquette proprement dite mais empêchent la libération d'A. D. P. intra-plaquettaire inducteur de la deuxième phase. C'est par ce mécanisme également qu'elles sont inhibitrices de l'agrégation par le collagène et la sérotonine.

- Les catécholamines et notamment l'adrénaline potentialisent l'agrégation induite par l'A. D. P. (43à et augmentent la libération de l'A. D. P. pendant la deuxième vague d'agrégation. Ces effets sont supprimés par les alpha bloquants et non modifiés par les Béta bloquants.

L'existence de récepteurs alpha sur la membrane plaquettaire expliquerait peut-être l'action des catécholamines. On sait également que l'action des catécholamines sur les récepteurs alpha des fibres musculaires lisses s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire au potassium. L'adrénaline pourrait agir sur les plaquettes de la même manière en accroissant la perméabilité de la membrane cytoplasmique (1).

Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

Un grand nombre de substances sont susceptibles d'inhiber l'agrégation plaquettaire in vitro. Elles ont fait l'objet de nombreuses recherches en vue de leur utilisation in vivo pour la prévention des thromboses. Elles sont souvent vaso-dilatatrices et cette propriété commune à un large groupe de substances inhibitrices amène à évoquer l'existence d'un rapport entre l'action inhibitrice et l'action vaso-dilatatrice.

Une réponse possible est qu'elles agiraient sur les protéines contractiles des plaquettes. De telles protéines ont pu être extraites de la membrane cytoplasmique plaquettaire qui est d'ailleurs le site d'action présumé de l'A. D. P. (41).

Parmi les drogues inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, nous ne citerons que celles utilisées en clinique humaine : la persantine, la phénylbutazone, l'acide acétyl-salycilique ont été testées in vitro et sur l'animal.

oOo

L'ADHESIVITE PLAQUETTAIRE

Propriété spécifique de la plaquette, l'adhésivité (1) fera l'objet de ce chapitre ; la microscopie électronique a permis de mieux saisir l'aspect intime de cette réaction particulière de la plaquette à différentes substances.

Définition et mesure de l'adhésivité plaquettaire

Le terme est difficile à définir de manière précise car il recouvre de nombreux phénomènes, chacun d'eux pouvant être rattaché à un mécanisme différent (15, 34, 35). In vivo, les plaquettes adhèrent au collagène du tissu conjonctif de soutien de l'endothélium vasculaire lésé ; in vitro, on a observé l'adhérence plaquettaire aux surfaces de verre. Mais l'adhésion au verre est différente : en effet, elle est inhibée par l'E. D. T. A. et défectueuse chez les malades souffrant de thrombasthénie, alors que l'adhésion au collagène n'est pas influencée par les cations divalents et est normale dans la thrombasthénie.

D'autre part, in vivo, on peut distinguer deux phénomènes, l'adhérence des premières plaquettes aux fibres conjonctives d'abord, puis l'adhérence des plaquettes provenant de la circulation générale, aux plaquettes déjà captées par le collagène, qui aboutit à la formation d'une masse plaquettaire.

Ce processus est nommé cohésion plaquettaire. Ainsi les tests d'adhésivité plaquettaire in vitro doivent refléter les deux phénomènes, adhésion et cohésion, pour être fidèles à l'observation clinique.

Les méthodes employées sont toutes fondées sur le même principe : la numération des plaquettes est effectuée avant et après passage du sang total ou de plasma riche en plaquettes sur une surface de verre, en présence ou non d'A. D. P.

Ce procédé a été simplifié pour l'application clinique (44).

Le sang natif est conduit à travers un filtre dans une colonne de billes de verre dans des conditions strictement standardisées. Une numération des plaquettes est faite après ce passage et elle est comparée à celle effectuée sur un prélèvement de contrôle ; le résultat est exprimé en pourcentage d'adhésivité par rapport au chiffre du prélèvement de contrôle ; chez les sujets normaux ; 30 à 50 % des plaquettes sont retenues par les billes de verre.

Des microphotographies des billes de verre après passage de sang confirment que l'adhésion et la cohésion plaquettaires se sont effectivement produites.

Les aspects biochimiques et métaboliques de l'adhésivité plaquettaire

HELLEM (22) découvrit le premier l'influence des globules rouges sur l'adhésivité des plaquettes aux billes de verre. Il a été ensuite démontré que les résultats des tests d'adhésivité dépendaient largement de la libération d'A. D. P. par les cellules rouges traumatisées : en effet, si l'A. D. P. est supprimé du système par dégradation enzymatique, l'adhésivité du sang total devient identique à celle d'un plasma riche en plaquettes, mesurée dans les mêmes conditions par ailleurs.

A ce moment, l'addition de globules rouges au plasma augmente l'adhésivité et si on utilise des globules rouges lésés, l'adhésivité est encore plus accrue. On pourrait alors conclure que les différences d'adhésivité plaquettaire entre les individus seraient fonction de la libération d'A. D. P. par les cellules rouges des sujets (40).

Les aspects métaboliques (45) de l'adhésivité plaquettaire ont été étudiés avec soin. Les différents paramètres mesurés, consommation

d'oxygène par les plaquettes, quantité d'A. T. P. intra-plaquettaire, taille des plaquettes, ne varient pas après passage du plasma riche en plaquettes à travers une colonne de billes de verre. On en a déduit que l'adhésivité plaquettaire appréciée par ces méthodes n'est pas déterminée par des fonctions métaboliques.

Enfin notons qu'il n'y a pas de corrélation entre la mesure de l'agrégation plaquettaire déterminée par méthode photométrique et celle de l'adhésivité appréciée après passage dans une colonne de billes de verre.

Les réactions d'adhésivité plaquettaire : ultrastructure

On a tenté de définir l'ultrastructure de la surface plaquettaire au cours de la réaction d'adhésion des plaquettes par l'étude de l'intéraction plaquettes fibrine pendant la rétraction du caillot et au cours de l'exposition à des particules préformées de fibrine (46).

- Dans les caillots en rétraction, plaquettes et fibrine sont observées en association étroite. Les plaquettes apparaissent dépourvues de granulations denses et de mitochondries. Leur configuration externe est altérée et leur membrane cytoplasmique semble rompue.

La fibrine peut être identifiée par son aspect opaque amorphe et irrégulier et par sa période caractéristique.

Dans toutes les préparations, la réaction la plus frappante et la plus certaine entre les plaquettes et la fibrine consiste dans les rapports étroits qui s'établissent entre leurs structures réciproques. Les rapports varient depuis le léger feston de la membrane plaquettaire en regard de la fibrine, jusqu'à l'englobement partiel, presque complet et même total de celle-ci par la membrane cellulaire. Les structures en rapport restent séparées par un espace de 50 à 250 Angströms. Enfin l'encerclement complet de la fibrine par la membrane plaquettaire est moins fréquemment noté que les autres types de rapport déjà cités.

- Il a été observé que les caillots obtenus par addition de thrombine à un plasma riche en plaquettes traité par l'E. D. T. A., ne se rétractent pas même après cinq heures d'incubation à trente sept degrés. La rétraction se produit si du calcium est ajouté dans le milieu trente minutes après la formation du caillot (47). Au cours de ces expériences, l'englobement de la fibrine par la membrane plaquettaire observable avant l'addition de calcium paraît très augmenté dans sa fréquence sur les préparations après la recalcification et l'achèvement de la rétraction.

- Enfin une observation supplémentaire peut être faite sur toutes les préparations, le contact apparemment direct entre plaquettes et fibrine qui contraste avec ce qui a été dit précédemment d'une intéraction à distance finie. Mais dans ces cas il existe alors constamment en chaque zone de la membrane plaquettaire où le contact paraît direct, une interruption de cette membrane qui s'étend parfois à sa portion immédiatement adjacente. Quand le rapport plaquette-fibrine s'établit à distance finie, la membrane plaquettaire est intacte.

Après exposition des plaquettes à des particules de fibrine préformées, la relation entre les structures paraît moins évidente que dans les caillots en réfraction. Cependant les mêmes rapports structuraux étroits et l'englobement apparent de la fibrine par la membrane cytoplasmique de la plaquette sont encore observables.

L'aspect, en microscopie électronique de la réaction plaquettes-fibrine se résume donc à des rapports structuraux étroits établis à distance caractéristique de 100 à 200 Angströms entre la molécule de fibrine et la membrane plaquettaire. Dans une apparente extension de ce processus, les plaquettes viennent entourer la fibrine. Des études utilisant d'autres techniques ont démontré que les plaquettes adhéraient à la fibrine (48, 49). L'adhésion entre structures étant définie comme leur association morphologique sélective et étroite ou par leur activité transitoire en tant qu'unité cinétique simple (50), on peut alors dire qu'il y a bien adhésion des plaquettes à la fibrine

dans les caillots en rétraction. Cette définition de l'adhésion prenant pour base la morphologie ultrastructurale, la question se pose alors de savoir dans quelle mesure elle reflète bien le processus d'adhésion des plaquettes au fibrinogène observable macroscopiquement.

L'observation de l'agrégation plaquettaire en microscopie électronique suggère que tel est le cas. En effet, en présence de thrombine, de collagène ou d'A. D. P. , les plaquettes adhèrent entre elles et s'agrègent. Les préparations obtenues montrent qu'elles se trouvent alors en relation structurale réciproque, formant fréquemment une mosaïque (51, 52) ; une distance finie persiste entre les membranes plaquettaires en rapport (53).

Enfin, l'intéraction des plaquettes avec les particules de latex (54) auxquelles elles adhèrent également, répond également à la même image ultrastructurale (55, 56).

Les chercheurs se sont penchés sur le problème de l'espace limité qui sépare deux cellules adhérentes : CURTIS (57) pense que ces cent à deux cents Angströms représentent la distance entre deux surfaces cellulaires pour laquelle les forces d'attraction et de répulsion sont en équilibre, donc le point de stabilité de l'adhésion. On a également suggéré que cet espace répondait à la présence d'une substance de la membrane cytoplasmique non visible en microscopie électronique (50, 58). Les mêmes mécanismes doivent expliquer la persistance d'un espace fini entre plaquettes et fibrine.

- Enfin, un autre aspect de la réaction d'adhésion des plaquettes à la fibrine mérite des commentaires.

La fibrine est apparue fréquemment en contact direct avec la plaquette et la membrane plaquettaire présente une interruption au point de contact : cette découverte de Hovig (59) est d'interprétation difficile. Des structures superposées sur différents plans peuvent sembler en contact. De plus, des surfaces empilées les unes sur les autres peuvent avoir leurs plans de section altérés et elles présentent alors des discontinuités. Néanmoins,

la fréquence et l'importance de cette observation évoque la possibilité d'un contact étroit entre plaquette et fibrine dans la zone d'interruption de la membrane. L'intégrité de la membrane cytoplasmique doit être nécessaire au maintien d'une séparation entre les deux structures ; une lésion de la membrane permettrait peut-être un contact plus étroit (46).

oOo

METABOLISME DES PLAQUETTES

Métabolisme glucidique

- La source de l'A. T. P. plaquettaire

Comme toute cellule, les plaquettes utilisent l'A. T. P. pour entretenir leurs activités métaboliques (14). La principale source de cette énergie est la dégradation du glucose qui peut se faire sur la mode aérobie ou anaérobie (14, 60). Les enzymes de la glycolyse sont plus actifs que ceux du cycle de Krebs, dans la plaquette, puisqu'on y trouve plus de glucose dégradé jusqu'au stade lactate pyruvate que jusqu'au terme gaz carbonique-eau. Pourtant la phosphorylatéon oxydative fournit treize fois plus d'A. T. P. par molécule que la glycolyse. Ces conclusions biochimiques sont aisément rattachées à des aspects ultrastructuraux des plaquettes observés en microscopique électronique : les mitochondries des plaquettes (siège de la voie métabolique qui passe par le cycle de Krebs) sont plus petites et ont moins de crêtes que celles des autres cellules. Il est rare que les mitochondries plaquettaires soient régénérées.

La courte durée de vie des plaquettes, huit jours, peut être rattachée au vieillissement des mitochondries et à la diminution conséquente de la production d'A. T. P. par les enzymes du cycle de Krebs et par la chaîne respiratoire associée à la mitochondrie.

Glycolyse et respiration ont une grande importance pour les fonctions plaquettaires. Ainsi l'inhibition métabolique par la cyanure et l'acide iodacétique simultanément, bloque le transport actif de potassium à l'intérieur

de la plaquette contre un gradient de concentration (61, 62). Quand glycolyse et respiration sont inhibées simultanément par les mêmes moyens, l'agrégation par l'A. D. P., l'adhérence au verre (61, 63) et la rétraction du caillot (61) n'ont plus lieu.

- Glycogène intra-plaquettaire

Les granulations de glycogène sont très nombreuses à l'intérieur des plaquettes. La glycogène synthétase (64) est présente dans les plaquettes et celles-ci peuvent incorporer de l'U. D. P. marqué au carbone 14 dans du glycogène. La synthèse du glycogène se poursuit pendant la coagulation et la rétraction du caillot (65). Enfin les plaquettes contiennent également une glycogène phosphorylase (65) qui ne devient complètement active que lorsqu'elles sont portées dans des milieux non physiologiques.

- Effets de la thrombine et du collagène

- La thrombine stimule pendant une période assez longue, l'oxydation du glucose par la voie d'Embden Meyerhof et du cycle de Krebs. Elle augmente également, sur une période plus brève, la production de lactate (66). D'autres études montrent que la thrombine accroît la production de lactate, en même temps qu'elle stimule la glycogénolyse (66). L'A. D. P., l'adrénaline et le collagène ont à peu près les mêmes effets bien que moins prononcés pour les deux premiers (67). Ces effets métaboliques s'accompagnent d'une diminution de l'A. T. P. et l'A. D. P. intracellulaire alors que les nucléotides extra-cellulaires sont augmentés (67, 68). L'accroissement de la glycolyse sous l'action du collagène pourrait être rattaché à un autre phénomène : la redistribution de l'hexokinase plaquettaire sous forme de particules solubles qui est observée lorsque les plaquettes sont exposées au collagène (69).

- Le collagène et les tissus conjonctifs agissent de manière différente sur la production de lactate par les plaquettes.

Traitées par le collagène, les plaquettes s'agrègent et produisent du lactate de façon linéairement croissante pendant une heure.

Traitées par les tissus conjonctifs, elles s'agrègent également mais la production de lactate cesse en quinze minutes. Ceci est dû à l'apport de cations divalents par les mucopolysaccharides acides des tissus conjonctifs. En effet, si on fait agir sur ceux-ci la hyaluronidase, la production d'acide lactique (70) par les plaquettes s'étale sur soixante minutes.

Les Protéines Plaquettaires

Elles ont été séparées et identifiées grâce aux techniques récentes (71, 72). Une quinzaine au moins ont été isolées par électrophorèse sur gel acrylamide. On peut les grouper en trois catégories :

- celles qui sont aussi dans le plasma : fibrinogène, albumine, globulines, plasminogène ;
- les facteurs plasmatiques de la coagulation : Facteurs V, X, XII (73, 74), XIII (75) :
- les protéines plaquettaires spécifiques : thrombasthénine, facteur 4 plaquettaire, facteur anti-héparine (75, 76).

On a pu démontrer la synthèse protidique à l'intérieur des plaquettes (77, 78). Celles-ci peuvent sélectionner des acides aminés pour leur synthèse protidique, contre un gradient de concentration (79).

Le métabolisme lipidique

- Phospholipides plaquettaires

Les phospholipides pouvant être substitués aux plaquettes dans les tests de coagulation sanguine in vitro, c'est avec un soin particulier que l'étude des phosphatides plaquettaires et tissulaires a été menée (80, 81). Le facteur 3 plaquettaire a fréquemment été considéré comme un phospholipide, mais ce terme n'est pas approprié puisqu'in vitro aucun substitut plaquettaire n'est plus actif que les lipoprotéines plaquettaires même. Le concept biochimique de facteur 3 plaquettaire doit donc être révisé. Les plaquettes participent probablement à la coagulation en fournissant un complexe lipidique (et non une entité biochimique simple) constitué tant par des phospho-

lipides que par d'autres classes de lipides. En effet, 20 % au moins des lipides totaux de la plaquette sont neutres et parmi ceux-ci 85 % sont constitués de cholestérol libre.

Une récente étude des lipides constituant les structures cellulaires de la plaquette (1) a montré que ni les granulations intra-plaquettaires ni la membrane cytoplasmique ne contenaient un lipide ou un acide gras caractéristique. Les activités biologiques attribuées à ces structures ne peuvent donc s'expliquer sur la base de leur seule composition lipidique (81).

- Métabolisme des acides gras

- Les différentes voies métaboliques des acides gras plaquettaires ont été étudiées par l'incorporation d'acide acétique marqué dans les lipides plaquettaires ; après incubation (82), 75 % de l'acide acétique marqué se trouvait incorporé dans trois classes de lipides : lécithines, céramides et acides gras libres. Les plaquettes ainsi traitées ont été portées dans le milieu plasmatique ; 40 % des lipides nouvellement formés ont été retrouvés dans ce milieu.

- Des expériences utilisant l'acide palmitique marqué ont confirmé que les acides gras plaquettaires étaient formés par synthèse de novo et par allongement des chaînes (83, 84). En ceci, les plaquettes diffèrent des autres cellules sanguines qui ne peuvent effectuer la synthèse de novo, car elles ne possèdent pas d'acétyl Coenzyme A. A l'inverse, les plaquettes contiennent l'équipement enzymatique nécessaire à cette synthèse et de l'acétyl Coenzyme A a été partiellement purifié à partir des plaquettes (84).

- Il a été évoqué que le métabolisme des acides gras des plaquettes soit spécialement réglé en fonction de leur rôle dans l'hémostase primaire et la coagulation (1).

La sérotonine plaquettaire

- Bien que les plaquettes manifestent une grande affinité pour la sérotonine, elles sont capables de la capter à l'intérieur de la cellule contre

un gradient de concentration, le rôle de cette amine dans la coagulation n'est pas évident (14).

On a seulement noté qu'en présence de calcium et de thrombine, de grandes quantités de thrombine sont libérées tout au long de la réaction de "libération" (85, 86). Le rôle de la sérotonine ainsi libérée n'a pas été identifié.

- La membrane cytoplasmique de la plaquette présente des sites récepteurs à la sérotonine, sites qui permettent son transfert dans le cytoplasme (86). Après avoir diffusé dans le cytoplasme, la sérotonine est stockée dans des granulations très osmiophiles, dites granulations denses. Ces granulations disparaissent en présence de composés tels que réserpine et amphétamine, et dans des conditions qui troublent l'intégrité biochimique ou structurale des plaquettes telles que l'incubation dans des milieux non physiologiques ou les thromboses in vivo (86).

Notons enfin que la sérotonine est un agent agrégant des plaquettes : l'agrégation est réversible et ne présente qu'une seule phase.

oOo

- DEUXIEME PARTIE -

LE SYNDROME DE WISCOTT-ALDRICH

Définition

Le Syndrome de Wiscott-Aldrich est une maladie héréditaire récessive liée au sexe associant :

- un déficit immunitaire qui le fait entrer dans le cadre des syndromes de déficit immunitaire compris par Krivit et Good.

- un eczéma, et,

- une diathèse hémorragique en rapport avec une thrombopénie constante associée à des anomalies qualitatives des plaquettes qui en font une thrombopathie.

La maladie se révèle dans les premiers mois de la vie et la survie des enfants ne dépasse pas, habituellement, quelques années, allant parfois jusqu'à l'adolescence.

Bien que notre propos soit consacré aux anomalies plaquettaires, nous exposerons brièvement les caractéristiques du déficit immunitaire.

LE DEFICIT IMMUNITAIRE DANS LE SYNDROME DE WISCOTT-ALDRICH.

De fréquence et de gravité variable, il se traduit par des infections répétées bénignes au début, qui s'aggravent après quelques mois ou quelques années.

Les agents infectieux sont extrêmement variés, pyogènes, virus, levures, et ils peuvent toucher toutes les sphères, essentiellement cutanées, O.R.L., broncho-pulmonaires et intestinales.

Biologiquement, ce syndrome se caractérise par un déficit complexe mais partiel de l'immunité cellulaire et humorale.

- Le déficit humoral consiste en une diminution du taux des Ig M alors que les Ig A sont normales ou augmentées. Le taux des gammaglobulines est normal. D'autre part les isoagglutinines sont diminuées de manière inconstante mais dans tous les cas leur taux ne s'élève pas après stimulation par les antigènes correspondants. Enfin, la stimulation antigénique par vaccins donne des résultats dissociés.

- Le déficit de l'immunité cellulaire est également partiel et tardif. La lymphocytose est normale puis diminue progressivement aux dépens des petits lymphocytes. Les réactions d'hypersensibilité retardée sont normales ou nulles, la transformation lymphoblastique induite par la phytohémagglutinine est normale et, est diminuée ou normale en présence d'antigènes solubles.

On peut mettre en parallèle la bonne tolérance du BCG et du VAV dans les premiers mois de la vie, alors que les vaccinations sont ensuite mal tolérées, avec la bénignité des infections, au début, puis leur aggravation.

- L'immunité non spécifique est normale.

La pathogénie du déficit immunitaire du syndrome de Wiscott-Aldrich n'est pas bien élucidée. Deux hypothèses tentent de l'expliquer (1, 2).

Le déficit de l'immunité humorale aurait pour cause primaire une incapacité de reconnaissance d'une certaine classe d'antigènes, les antigènes polysaccharidiques par les cellules immuno-compétentes alors que la capacité de production des anticorps reste normale. Il s'agit donc d'une anomalie de la voie afférente de l'immunité. Cette anomalie aurait pour conséquence des agressions multiples du système réticulo-endothélial par les antigènes, ce qui entraînerait une prolifération de ce système et une lymphopénie avec anomalie des lymphocytes d'où altération de l'immunité cellulaire.

Cette hypothèse s'appuie sur les arguments suivants :

- La réponse immunitaire aux antigènes protéiques est normale ; les anticorps produits sont de la classe 15 S et 7 S donc il y a production d'Ig M. En revanche, la réponse immunitaire aux antigènes polysaccharidiques est nulle. La réponse à la stimulation par les antigènes de Forsman est dissociée de la même manière : En effet, les homolysines dirigées contre des antigènes saccharidiques sont diminuées alors que les agglutinines produites contre la fraction protéique des hématies de mouton sont à un taux normal.

- Le fait que la déplétion lymphocytaire, les infections graves et la mauvaise tolérance aux vaccins surviennent au cours de l'évolution suggère une anomalie secondairement acquise de l'immunité cellulaire. Enfin, la prolifération du système réticulo-endothélial souvent observée chez ces malades et parfois susceptible de dégénérescence, est également en faveur d'une agression antigénique contre le système réticulo-endothélial.

- Une deuxième hypothèse expliquerait le déficit de l'immunité cellulaire par un défaut enzymatique des macrophages.

Les essais thérapeutiques

consistent à transférer l'immunité de donneurs normaux aux sujets atteints de la maladie par greffe de cellules immunologiquement compétentes ou par administration du "Facteur de transfert" de Lawrence (3).

- La première méthode, la plus ancienne, est donc réalisée par greffe de moelle osseuse allogénique ; le grand inconvénient de cette thérapeutique est comme pour toute transplantation la réaction du greffon contre l'hôte, d'autant qu'il est difficile d'instituer un traitement immunosuppresseur chez des sujets déjà déficients. Les succès thérapeutiques ont été rares.

- Le facteur de transfert consiste en un dialysat de leucocytes du sang circulant provenant de donneurs normaux. Lawrence découvrit en 1955 que ces dialysats étaient capables de transférer à des sujets non sensibilisés,

la positivité de réactions d'hypersensibilité retardée possédée par les donneurs, pour des antigènes spécifiques. Ainsi, les dialysats de leucocytes provenant d'un donneur dont les réactions cutanées à la tuberculine sont positives confèrent à un donneur non sensibilisé dont les réactions sont donc négatives, la positivité de ces tests. L'administration de facteur de transfert provenant de donneurs sensibilisés à de nombreux antigènes, à des malades atteints de syndrome de Wiscott-Aldrich leur transmettrait ainsi passivement les composants cellulaires de l'immunité nécessaires pour résister à de nombreuses infections.

- Le facteur de transfert n'est pas immunogène ; il ne comporte pas d'antigène d'histocompatibilité et n'apporte pas de cellule viable capable de déclencher une réaction de rejet.

- Son mécanisme d'action n'est pas clair : il agirait comme co-facteur ou anti-répresseur des nucléotides ou par apport d'ARN messager ribosomal ou de transfert.

Les essais thérapeutiques sont encore trop récents pour qu'on puisse conclure de son efficacité dans le traitement du syndrome de Wiscott-Aldrich.

o0o

LA DIATHESE HEMORRAGIQUE DANS LE SYNDROME DE WISCOTT-ALDRICH

Trois observations vont nous servir d'introduction à l'étude du syndrome hémorragique dans la maladie de Wiscott-Aldrich, dans son expression clinique puis dans ses aspects biologiques.

Nous tenterons ensuite à partir des résultats des investigations entreprises chez nos malades et d'autres cas publiés, de définir les altérations des plaquettes dans la maladie de Wiscott-Aldrich.

Observations

L'enfant Jean-Jacques B... est né le 8 Mars 1963. La maladie se révèle chez lui à l'âge de cinq mois par un purpura petechial du cou, du nez et de l'abdomen, d'emblée associé à un eczéma du visage. Il existe une hépatosplénomégalie. Deux mois plus tard, on reconnait sur une plaquettose à 35.000 l'origine thrombopénique de ce purpura. Une corticothérapie est entreprise qui fait monter à 160.000 le chiffre des plaquettes et qui améliore sans les faire disparaître, les signes cutanés auxquels viennent bientôt s'ajouter de discrètes hémorragies rectales. Tout essai d'arrêt du traitement entraîne une aggravation du syndrome hémorragique, purpura généralisé et épistaxis très abondantes dont le retentissement général impose des transfusions répétées.

Pendant cinq ans le traitement corticoïde est donc poursuivi en cures continues ou discontinues, mais épistaxis et purpura ne cèdent pas. Un bilan pratiqué lors d'une hospitalisation à l'âge de cinq ans et demi objective :

- un retard staturo-pondéral important dû tant à la corticothérapie qu'à l'anémie chronique, entretenue par les hémorragies cutanées et muqueuses ;

- l'eczéma localisé au siège et aux régions inguinales ;

- enfin, on note la discrétion et la relative rareté des épisodes infectieux qui ont débuté à l'âge de dix-huit mois et répondent bien au traitement antibiotique. L'évolution reste ensuite émaillée des mêmes incidents hémorragiques et infectieux et trois hospitalisations pour explorations et essai thérapeutique par le facteur de transfert nous ont permis pendant l'année 1971-1972 de détailler les éléments actuels du syndrome hémorragique : - purpura pétéchial atteignant les membres avec poussées ecchymotiques et généralisation à certains moments, - épistaxis méchées et hématémèse abondante (350 ml) de sang dégluti au cours d'une épistaxis qui a entraîné un état préoccupant d'anémie aigue.

Le traitement corticoïde est ajusté suivant l'état général et la gravité des hémorragies plus que sur le chiffre des plaquettes, resté bas pendant toute l'évolution, et les signes cutanés persistants.

Au total, chez cet enfant, c'est le syndrome hémorragique qui a dominé l'évolution du syndrome de Wiscott-Aldrich : il en a été le premier symptôme et a posé des problèmes pronostiques et thérapeutiques préoccupants, - nécessité de nombreuses transfusions, Cushing iathrogène -, alors que les infections sont restées bénignes et discrètes.

- A l'inverse, notre deuxième observation se caractérise par la pauvreté de l'expression clinique du déficit plaquettaire malgré une thrombopénie évidente.

C'est à l'occasion d'un épisode infectieux à localisation cutanée et otitique que le jeune B... est hospitalisé à l'âge de trois mois en décembre 1967. Rapidement sont alors réunis les trois éléments du syndrome de Wiscott-Aldrich :

- des infections récidivantes à localisation variée,
- un aspect eczémateux du visage,
- un purpura pétéchial et ecchymotique lié à une thrombopénie à 40.000, mais discret et localisé aux membres inférieurs.

Pourtant le diagnostic assez évident cliniquement est plus difficile à assurer sur les explorations immunitaires, le seul déficit constaté étant un taux nul d'isoagglutinines.

C'est l'association de ce déficit à une thrombopénie d'origine centrale qui a permis d'affirmer la nature de la maladie.

L'évolution jusqu'à l'âge de trois ans et demi est essentiellement marquée par la répétition des infections O.R.L. et pulmonaires. Le syndrome hémorragique reste très discret malgré la thrombopénie (25.000 plaquettes). Jusqu'à l'âge de un an et demi, il se résume à quelques pétéchies. Ensuite apparaissent des épistaxis abondantes et répétées imposant une corticothérapie ; des signes cutanés sont alors faits de quelques éléments pétéchiaux sur le corps et de nombreux hématomes aux points de piqûre, associés à un eczéma discret du visage et des membres inférieurs.

Au bout de deux ans, la corticothérapie a pu être abandonnée. Les taux de plaquettes pendant cette période se sont maintenus autour de 30.000 avec des chiffres plus bas parfois à 12.000 et 15.000 sans incident aigu correspondant.

Actuellement, l'enfant présente comme seuls signes cliniques du déficit plaquettaire quelques pétéchies et quelques ecchymoses traumatiques.

En conclusion, c'est la part limitée du syndrome hémorragique, marqué seulement pendant une longue période par un purpura pétéchial discret et localisé, qui retient notre attention dans cette observation.

- Le jeune M... né le 11 Juillet 1962 est le deuxième enfant d'une famille sans antécédent pathologique notable en dehors d'une tendance aux ecchymoses retrouvée chez la mère par l'interrogatoire.

Le nourrisson est hospitalisé pour la première fois à l'âge de trois mois pour un purpura. La plaquettose est alors de 50.000 et le diagnostic de purpura thrombopénique idiopathique est retenu, aucune autre étiologie n'étant alors retrouvée : la moelle est normale, il n'y a pas de notion d'intoxication, pas d'anticorps anti-plaquettaires. Une corticothérapie à dose forte 4 mg/kg fait remonter à 80.000 le taux des plaquettes et peut ensuite être abaissée sans incident.

Jusqu'à l'âge de deux ans l'enfant est régulièrement suivi : Aucune aggravation du purpura, ni aucun autre signe hémorragique ne sont notés. Les plaquettes restent à 60.000. Le seul incident infectieux notable est une méningite à pneumocoques survenue à l'âge de cinq mois et compliquée d'un hématome sous-dural guéri sans séquelles. A l'âge de deux ans, une splénectomie est pratiquée chez l'enfant : la rate pèse 23 grs et l'examen histologique aurait évoqué une surcharge. Après cette intervention les plaquettes remontent à 200.000 et la corticothérapie est interrompue.

Pendant les trois années suivantes, l'évolution de la maladie est marquée d'une série d'incidents infectieux dont les plus notables sont un zona thoracique non hémorragique, et un épisode hautement fébrile avec polynucléose et vitesse de sédimentation accélérée, qui s'est rapidement résolu sous traitement antibiotique. Sur le plan hématologique, la plaquettose s'est maintenue à des chiffres assez élevés, 150.000 plaquettes, alors que surviennent des poussées purpuriques. C'est donc en 1967 seulement que, devant l'association, chez cet enfant de cinq ans et demi, d'infections récidivantes et de purpura thrombopénique, le diagnostic de Syndrome de Wiscott-Aldrich est évoqué. Les explorations immunitaires le confirment.

L'évolution se poursuit ensuite sur le même mode ; entre deux poussées purpuriques - plaquettose à 160.000 et 35.000 -, le purpura pétéchial est discret et coexiste avec une plaquettose à 270.000. Les épisodes infectieux dont certains graves, sont jugulés par l'antibiothérapie et des injections de gammaglobulines. Ainsi, à la seule vue des chiffres de plaquettes, on ne peut pas ne pas s'étonner de la dissociation biologico-clinique

chez ce malade. Alors qu'une plaquettose normale à 230.000 va de pair avec un purpura diffus, on notera quelques mois plus tard une chute des plaquettes à 100.000 et un purpura limité à quelques pétéchies des membres inférieurs et à des ecchymoses traumatiques.

La variabilité des chiffres de plaquettes d'un mois à l'autre est également remarquable.

Cette discordance hémato clinique évoque l'existence d'une thrombopathie dans le syndrome de Wiscott-Aldrich, qui a été prouvée biologiquement dans cette observation comme dans la précédente et dans de nombreux autres cas.

Pour les trois observations, les données hématologiques, numération et formule sanguine, reflètent la tendance évolutive de la maladie ; l'anémie hypochrome chronique dans le premier cas, avec des taux de globules rouges allant de 2 millions 400.000 à 3 millions, est entretenue par un syndrome hémorragique cutanéo-muqueux. Au contraire, le purpura discret a un retentissement humoral peu marqué dans les deux autres cas.

Pour la lignée blanche, on notera l'hyperleucocytose et la polynucléose fréquentes en rapport avec des épisodes infectieux, et le taux bas de petits lymphocytes (entre cinq et 10 %).

Nous résumons sur un tableau les taux de plaquettes les plus élevés et les plus bas observés pendant la maladie ainsi que les chiffres moyens.

	Minimum	Maximum	Chiffres moyens
Jean-Jacques B.	12.000	54.000	30 à 40.000
B.	12.000	70.000	30 à 40.000
M.	50.000	270.000	130 à 200.000

Dans les trois cas, la thrombopénie est évidente mais si elle reste pratiquement constante et sévère malgré le traitement dans les deux premiers cas, elle est modérée et intermittante dans le troisième cas. Enfin, on

remarque dans le deuxième cas, un contraste entre la discrétion des signes hémorragiques et la thrombopénie majeure.

En conclusion de ces observations, si la thrombopénie parait l'aspect le plus clair et un élément constant de la diathèse hémorragique dans le syndrome de Wiscott-Aldrich, il convient de remarquer des anomalies fonctionnelles des plaquettes, qui expliquent la discordance hémato-clinique rencontrée et qu'on objectivera par des investigations complémentaires.

Chez nos malades, elles ont porté sur l'hémostase et les fonctions plaquettaires, agrégation à l'ADP et au collagène, et sur l'origine de la thrombopénie.

- Hémostase

	Rétraction du caillot	Temps de Coagulation	Temps de Quick	Prothrombine résiduelle
J.J.B. plaquettose 30.000	nulle	N	78 %	74 %
B..	normale	- résultats normaux -		
M.. plaquettose 108.000	normale	N	90 %	8,5 %

Les taux des facteurs plasmatiques de la coagulation sont dans les limites de la normale chez les trois malades.

En conclusion, l'étude de la coagulation sanguine ne revèle pas d'anomalie particulière. L'absence de rétraction du caillot observée dans le premier cas et la diminution de la consommation de prothrombine sont à rattacher à la thrombopénie.

La thrombopénie a été explorée par trois examens : les médullogrammes qui renseignent sur le nombre et l'aspect des mégacaryocytes d'où dérivent les plaquettes sanguines, la recherche d'anticorps anti-plaquettes dans le sang périphérique, enfin la durée de vie des plaquettes marquées en antotransfusion et en isotransfusion.

Les explorations n'ont pu être complètes que chez l'enfant M.. en raison de la bénignité du purpura et des taux souvent élevés de plaquettes.

- Médullogrammes

	Richesse	Série rouge	Série granuleuse	lignée non myéloïde	mégacargocytes
J. J. B.	+	28	52, 5	19, 5	0
	+	46	53	2	
	+	29	62	7	7 %
B.	+++	20	50	20	+++
	+++	27	53	16	++
	+	16	51	29	rares
	+++	30	43	18	++
M.	++++	24	65	12	assez nombreux
	++++	16, 5	58, 5	25	5 %

Dans les trois cas, sur des médullogrammes effectués à des périodes différentes de la maladie, on note :

- une moelle constamment riche ou très riche,
- une formule normale à l'exception d'une déplétion lymphoïde chez J. J. B..
- des mégacaryocytes présents au nombre normal et d'aspect normal.

Enfin, la recherche des anticorps anti-plaquettaires a été négative dans les trois cas, à plusieurs reprises.

Durée de vie des plaquettes.

L'examen n'a pu être pratiqué chez l'enfant Jean-Jacques B., la thrombopénie étant trop sévère.

- Chez l'enfant B., on a étudié la demi-vie des plaquettes isologues provenant d'un sujet normal marquées par une dose de 10 microcuries de chrome 51. Les résultats sont consignés sur le tableau suivant :

		Malade	Témoins
durée de 1/2 vie		7 jours	→ 8 11 jours
pourcentage des plaquettes marquées circulant après	1 heure	6 %	→ 10 20 %
	24 heures	3,5 %	→ 15 40 %

La courbe de radioactivité a un aspect normal ne présentant pas de pic de remise en circulation. De cet examen, on peut conclure que les plaquettes d'un sujet normal transfusées à un malade atteint de maladie de Wiscott-Aldrich ont une durée de vie normale. Il n'y a donc pas dans ce

syndrome de destruction périphérique des plaquettes par un facteur extra-corpusculaire.

- Chez l'enfant M., la même étude a été faite en autotransfusion par marquage radio-actif. Cependant la fragilité des plaquettes a empêché d'avoir des résultats complets, en raison d'un très mauvais taux de récupération. La seule donnée précise a été la demi-vie plaquettaire : elle est de cinq jours et demi, donc raccourcie.

- De ces explorations on peut conclure que dans le syndrome de Wiscott-Aldrich, la thrombopénie n'a pas pour origine l'existence d'un facteur extra-corpusculaire qui produirait une destruction accrue des plaquettes, comme en témoignent la durée de vie normale des plaquettes d'un sujet normal transfusées à un malade, et l'absence d'anticorps anti-plaquettaires.

- Il s'agirait donc d'une thrombopénie centrale. On peut invoquer deux hypothèses : soit un défaut de production médullaire, mais dans les trois cas observés l'aspect et le nombre normal des magacaryocytes dans une moelle souvent très riche infirment cette hypothèse, soit un défaut intra-corpusculaire des plaquettes qui entrainerait une séquestration et une destruction exagérée des plaquettes par la moelle et la rate. Le raccourcissement de la durée de vie des plaquettes du malade marquées au chrome 51 étayerait cette hypothèse.

Nous verrons que d'autres publications et des études plus précises de la structure et du métabolisme plaquettaire viendront la renforcer (5, 6, 7).

Les fonctions plaquettaires,

ont été étudiées par l'agrégation des plaquettes en présence de collagène, en présence d'ADP et d'adrénaline. Elles ont été réalisées chez l'enfant M.. et chez sa mère. Les courbes obtenues permettent de conclure que l'agrégation à l'ADP est diminuée chez le malade et normale chez sa mère. Le maximum d'agrégation se situe en même temps pour le témoin et le malade ; la diminution de l'agrégation plaquettaire en présence de collagène et d'adrénaline est encore plus nette, toujours par rapport à un témoin normal.

Les mêmes anomalies sont retrouvées à deux examens pratiqués à trois mois d'intervalle.

- la consommation de l'ADP est diminuée chez le malade mais accélérée,
- le facteur 3 plaquettaire est normal,
- on a terminé les explorations des plaquettes sanguines par une étude de la morphologie des plaquettes en microscopie électronique, chez les trois malades et chez deux témoins normaux.

- Les techniques classiques ont été étudiées.

- Chez les trois malades, les anomalies plaquettaires sont évidentes et pratiquement identiques.

Microscopie électronique des plaquettes dans la maladie de Wiscott-Aldrich.

Nous avons utilisé les techniques classiques :

- fixation glutasaldéhyde, puis tétroxyde d'osmium,
- deshydratation par l'éthanol en concentrations croissantes,
- inclusion des blocs de gélatine et coupes, enfin coloration et examen.

Nous avons choisi les photographies qui nous paraissent les plus démonstratives des défauts plaquettaires rencontrés.

Nous avons évidemment opéré pour chaque malade sur un plasma riche en plaquettes obtenu par centrifugation. Pourtant nous insisterons sur les difficultés techniques à l'examen de nombreuses plaquettes d'un même sujet en raison de la thrombopénie : De nombreuses coupes doivent être effectuées avant d'obtenir une seule plaquette. Or, pour que l'étude soit significative, il faut examiner une dizaine de plaquettes pour chaque malade.

Chez les trois malades les anomalies plaquettaires sont évidentes et pratiquement identiques.

Elles portent sur la taille très petite et très variable : le diamètre maximal des plaquettes des malades varie entre 0, 5 et 2 microns.

Les anomalies morphologiques sont les plus frappantes ; les plaquettes normales si elles n'ont pas une géométrie rigoureuse, ont cependant une forme régulière sphérique elliptique ou arrondie en coupe, et présentent peu de prolongements. A l'inverse, les plaquettes des malades paraissent déchiquetées avec une limite très tourmentée et de nombreux pseudopodes.

Le contenu plaquettaire est également modifié : bien que l'ultrastructure générale soit conservée, on retrouve en effet comme dans les plaquettes normales, la membrane cytoplasmique continue qui limite le cytoplasme granuleux contenant les différentes organelles. Mais ces structures cellulaires apparaissent altérées :

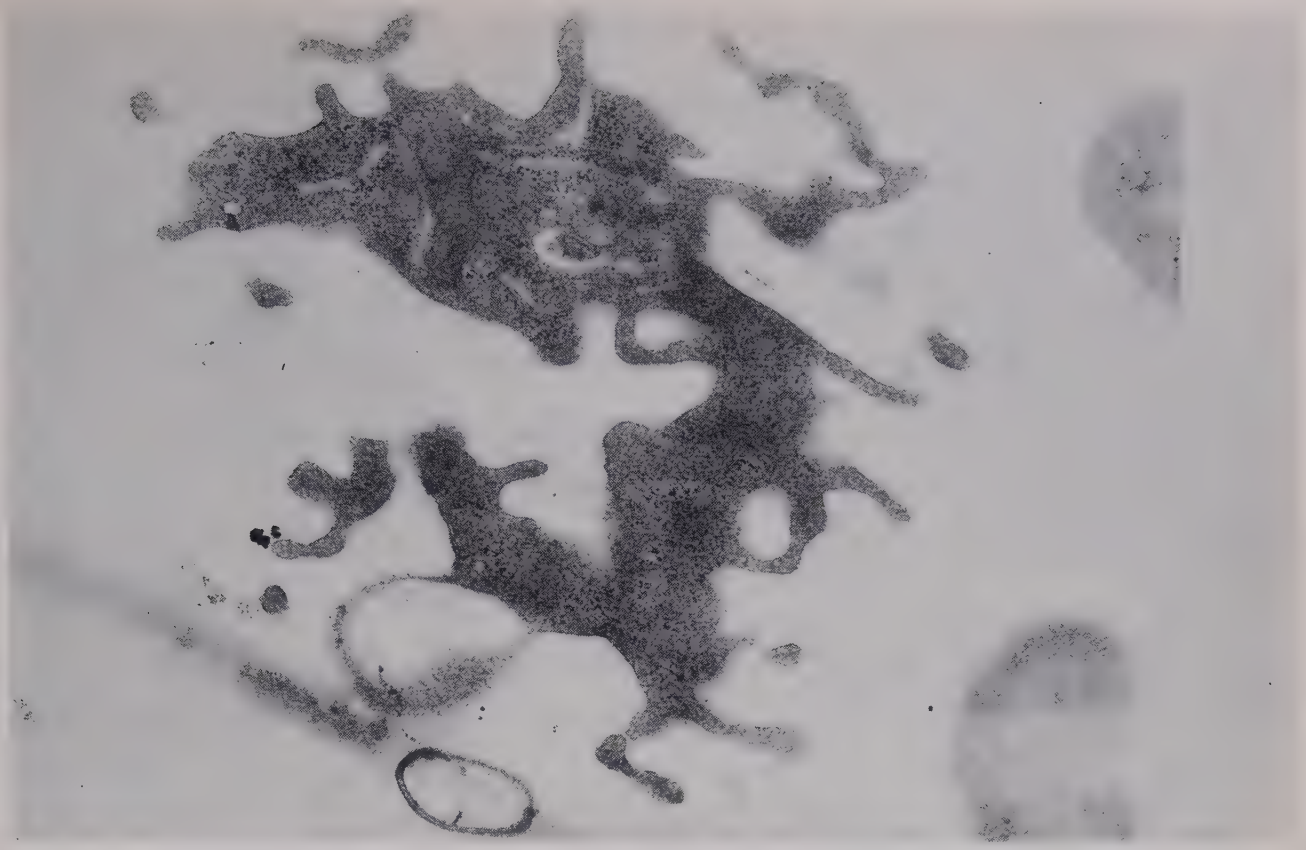
- la membrane cytoplasmique est irrégulière avec de nombreuses indentations.

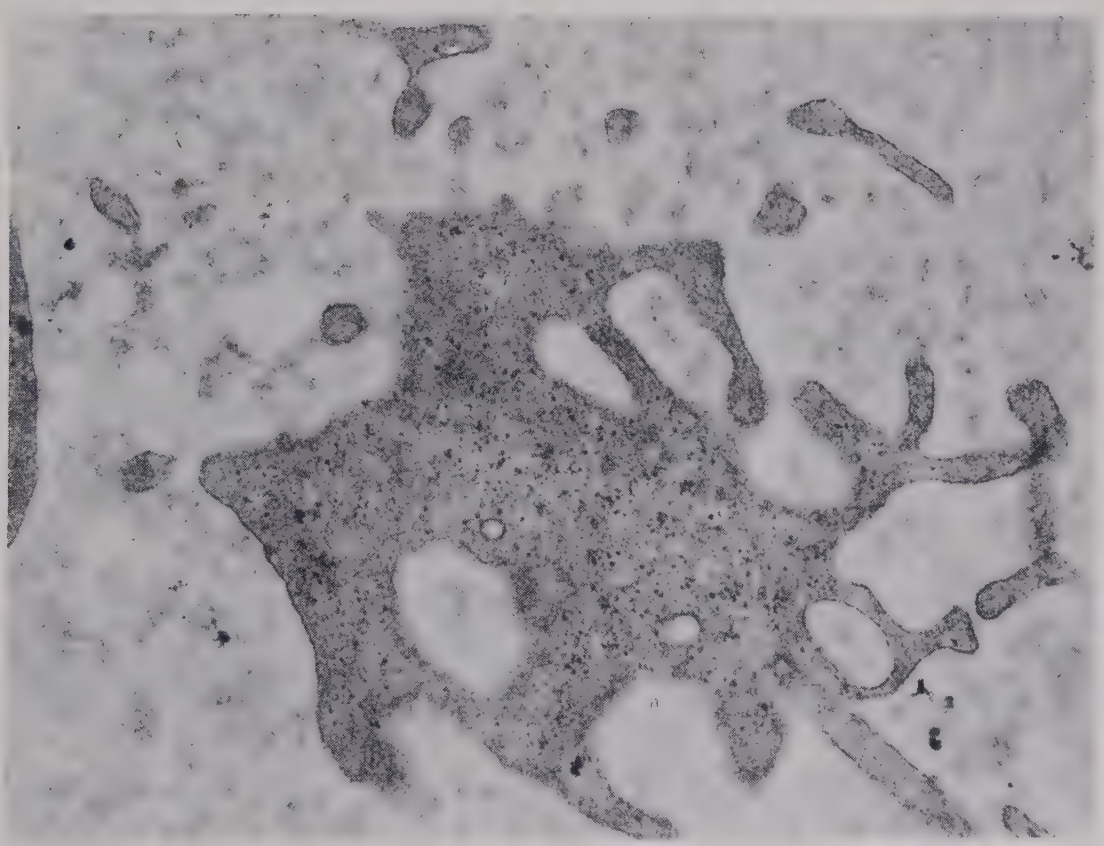
- on remarque surtout la rareté des organelles intra-cytoplasmiques par rapport à une plaquette normale ; le cytoplasme paraît "deshabité" et uniforme. On note trois altérations essentielles :

- Les granulations α (ou lysosomes) sont absentes ou très rares et dans ce cas, la zone osmiophile est diminuée et leur contenu est de densité peu différente du cytoplasme avoisinant. Les granulations osmiophiles, qui contiennent la sérotonine plaquettaire sont également très rares.

- Les Mitochondries sont très réduites en nombre, ou absentes. Quand elles sont observées, elles paraissent plus grandes que normalement et de forme allongée.

- Enfin le système tubulaire dense est le plus souvent chez les trois malades distendu et hypertrophié. Les structures tubulaires sont plus nombreuses, leur grand axe correspond au plus grand axe de la plaquette (longitudinal en coupe transversale). Elles sont situées au centre de la cellule, souvent associées aux mitochondries, alors qu'elles sont périphériques dans les plaquettes normales (4). Toutes ces anomalies ont d'ailleurs été observées par d'autres chercheurs sur des plaquettes de malades atteints du syndrome de Wiscott-Aldrich.





Plaquettes des enfants B. et J.J.B.... atteints de syndrome de Wiscott-Aldrich

Les autres structures plaquettaires apparaissent normales.

Les microtubules sont présents en coupe longitudinale ou transversale. Le système vacuolaire ne présente pas d'altération définie.

Les granulations de glycogène sont dispersées dans le cytoplasme ou groupées en agrégats comme dans les plaquettes des témoins.

Dans ces plaquettes très altérées, dépourvues pour la plupart de mitochondries et de granulations alpha, les granulations de glycogène apparaissent comme la seule réserve énergétique et le seul témoin d'une activité métabolique de la cellule (4).

Des études portant sur un plus grand nombre de plaquettes d'un même sujet permettant de faire des comparaisons significatives ont permis à d'autres auteurs de noter, en outre (4) :

- que la diminution du nombre de mitochondries allait de pair avec la disparition des granulations alpha dans les plaquettes ;

- que les granulations de glycogène étaient diminuées dans les plaquettes pauvres en granulations alpha et en mitochondries.

En conclusion, nous notons donc l'existence d'anomalies ultrastructurales bien déterminées qui consistent essentiellement en une réduction voire une absence du support cellulaire des activités métaboliques de la cellule, qui rend bien compte des anomalies déjà rencontrées dans l'exploration plaquettaire des sujets, essentiellement absence d'agrégation aux différents agents, et défaut de consommation d'ADP.

Au terme de ces observations tant cliniques que biologiques et morphologiques concernant le syndrome hémorragique dans la maladie de Wiscott-Aldrich, nous pouvons noter trois anomalies essentielles des plaquettes sanguines :

- une thrombopénie qui paraît être en rapport avec un défaut intrinsèque des plaquettes particulier à cette maladie ;

- des altérations fonctionnelles des plaquettes,

- et, enfin, des défauts ultra-structuraux consistant essentiellement en une anisocytose et des altérations des organites cytoplasmiques.

Signalons que ces anomalies sont retrouvées de manière constante par de nombreux chercheurs (5, 6, 7). La thrombopénie du syndrome de Wiscott-Aldrich se trouve ainsi située au sein d'un ensemble d'altérations plaquettaires qui réalisent une thrombopathie.

Ainsi se trouve posée, à l'évidence, la question d'un rapport entre thrombopénie et thrombopathie dans ce syndrome, et il paraît logique de lier les éléments quantitatifs et qualitatifs du déficit plaquettaire à un défaut primaire des plaquettes propres à cette maladie. C'est la nature de ce défaut qu'à travers les travaux des chercheurs, nous allons essayer de déterminer.

oOo

DEFAUT PRIMAIRE DES PLAQUETTES DANS LA MALADIE DE WISCOTT-ALDRICH OU ANOMALIES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES.

Certains auteurs ont d'abord invoqué un trouble de la maturation plaquettaire dans les mégacaryocytes médullaires (7). Ils étayent leur hypothèse par les arguments suivants : formations plaquettaires rares à l'intérieur des mégacaryocytes médullaires, défauts structuraux des mégacaryocytes qui présentent une hypersegmentation et une dégénérescence nucléaires malgré la faiblesse de l'activité de formation plaquettaire.

Ces anomalies trouvées également sur les médullogrammes de sujets normaux seraient selon les auteurs plus fréquentes dans la maladie de Wiscott-Aldrich, mais elles ne sont pas retrouvées chez tous les malades étudiés.

Mais pour d'autres équipes, les mégacaryocytes n'ont pas paru présenter des anomalies significatives et un défaut de production centrale des plaquettes a été formellement éliminé (4).

En effet, les auteurs trouvent chez deux patients présentant une thrombopénie sévère, une production plaquettaire quotidienne normale. Cette production est évaluée chez les sujets normaux à 35.000 plaquettes pour 24 heures. Chez les patients étudiés, la durée de vie des plaquettes marquées en autotransfusion est de deux jours. Or, leur plaquettose au même moment est de 38.500 pour l'un et 34.700 pour l'autre, étant donné le raccourcissement évident de la vie des plaquettes de ces sujets, ces chiffres reflètent bien leur capacité de production médullaire qui est donc normale.

D'autre part, chez les mêmes patients, l'étude des mégacaryocytes en microscopie électronique montre une morphologie grossièrement normale avec un réticulum endoplasmique bien développé voire même dilaté, et une à trois plaquettes intra-vacuolaires dont la densité électronique paraît supérieure à celle du cytoplasme mégacaryocytaire.

Enfin, le raccourcissement de la durée de la vie des plaquettes autologues suggère, comme nous l'avons déjà vu, une destruction périphérique accrue.

- L'hypothèse d'un défaut intra-corpusculaire des plaquettes permettrait d'expliquer d'une part la thrombopénie, et d'autre part les anomalies fonctionnelles des plaquettes : celles-ci seraient dues à des troubles métaboliques des plaquettes, eux-mêmes en rapport avec des altérations d'un ou de plusieurs organites cellulaires, support des activités biologiques de la plaquette.

Nous commencerons donc par exposer les troubles du métabolisme plaquettaire dans le syndrome de Wiscott-Aldrich, puis nous tenterons de les rattacher ensuite à un défaut ultra-structural particulier des plaquettes.

METABOLISME PLAQUETTAIRE DANS LE SYNDROME DE WISCOTT-ALDRICH.

Les recherches ont surtout porté sur le métabolisme glucidique et les nucléotides plaquettaires.

En effet, les investigations fonctionnelles orientent vers des anomalies du métabolisme énergétique plutôt que du métabolisme lipidique ; le facteur 3 plaquettaire normal, la coagulation normale chez les patients, suggèrent l'intégrité des facteurs plaquettaires impliqués dans la coagulation, c'est-à-dire les facteurs lipido-protidiques. En revanche, la diminution de l'adhésivité plaquettaire et de la capacité d'agrégation à l'adrénaline et au collagène, le défaut de captation de la sérotonine pourraient être liés à un déficit énergétique.

Explorations des nucléotides plaquettaires (4).

Le contenu plaquettaire en ATP et la concentration de ce nucléotide dans le surnageant ont été mesurées après stimulation de la libération de l'ATP plaquettaire, par le sérum salé puis par le collagène.

Le contenu plaquettaire en ATP est légèrement diminué en présence de sérum salé. Il est également modérément réduit en présence de collagène alors que chez un témoin normal, il est réduit de 50 %. De façon corrollaire, dans le surnageant, de très petites quantités d'ATP sont libérées par les plaquettes des malades, en présence de collagène, alors que chez un témoin normal, on retrouve 80 % de l'ATP plaquettaire dans le surnageant.

L'ADP est présent en très petite quantité dans les cellules et en quantité négligeable dans le surnageant, même en présence de collagène.

En rapportant le contenu plaquettaire d'ADP à la taille des plaquettes, on trouve encore une diminution de ce contenu égale à trois fois la normale.

L'incorporation de phosphore marqué a permis d'évaluer la capacité de stockage des nucléotides par les plaquettes. Comparé à celui d'un témoin normal, le stockage d'ATP apparaît augmenté et celui d'ADP encore plus accru.

On en conclut que, bien que chez ces malades, le pool nucléotidique intra-plaquettaire soit diminué, ce pool est métaboliquement actif et par conséquent, le métabolisme protidique n'est pas directement en cause dans les anomalies fonctionnelles des plaquettes.

Anomalies du métabolisme glucidique.

C'est en effet dans le métabolisme glucidique que résident les anomalies biologiques fondamentales des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich. Or, on sait que toute l'énergie des plaquettes provient de cette voie métabolique, ce qui explique l'expression fonctionnelle de ces troubles comme une thrombopathie.

Les explorations qui ont été pratiquées (5, 6) concernent la glucolyse aérobie ou anaérobie, c'est-à-dire respectivement l'activité du cycle de Krebs et la production de lactate évaluées à l'état basal et après stimulation par l'adrénaline ou par des particules de latex. Elles ont porté sur un enfant atteint de syndrome de Wiscott-Aldrich (plaquettose de 18.000... à 50.000 plaquettes) et sur sa mère (plaquettose normale). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les mêmes études avec des plaquettes de sujets normaux.

- L'activité glycolytique a été évaluée de la manière suivante : une suspension de plaquettes à une concentration donnée identique pour témoin et malade est incubée en présence de substrat, glucose marqué au carbone 14 sur son carbone 1 ou son carbone 6. On mesure alors sur un temps déterminé la production de $C0_2$ marqué et de lactate marqué obtenu à partir du glucose marqué en C_1 et du glucose marqué en C_6. Seul le $C0_2$ produit à partir du glucose marqué en C_6 reflète l'activité du cycle citrique.

La production évaluée en moles, est rapportée au nombre de plaquettes et exprimée en pourcents par rapport au témoin.

La même étude a été effectuée après incubation des plaquettes en présence de particules de latex et d'adrénaline. Les résultats révèlent :

- une diminution sensible de la production de $C0_2$ obtenu à partir de glucose marqué en C_6 qui est de 50 à 60 % de la normale ;

- une diminution de la production de lactate qui est de l'ordre de 35 à 55 % de la normale.

Enfin, la production de $C0_2$ provenant du glucose marqué en C_4 est pratiquement normale. Après stimulation du métabolisme glucidique des plaquettes, alors que chez les témoins la production de $C0_2$ et de lactate est augmentée de 8 à 12 fois en présence d'adrénaline, elle reste inchangée par rapport à l'état basal chez le malade et chez sa mère.

- Il faut noter cependant, que si les résultats sont rapportés au contenu plaquettaire évalué par le stock protidique intra-cellulaire, les différences de réponses entre témoins et malade ne sont plus sensibles. En effet, la charge protéique intra-plaquettaire est diminuée de 35 % chez le malade.

- Enfin, l'étude du shunt des hexoses-mono-phosphates (6) par stimulation de cette voie métabolique par le bleu de méthylène, a montré que la captation du glucose par les plaquettes et l'activité de ce shunt étaient normales chez le malade et chez sa mère.

D'autre part, en étudiant exclusivement le shunt des hexoses monophosphates, la stimulation par l'adrénaline ou par les particules de latex n'entraîne pas d'augmentation de la production de $C0_2$, ni chez les témoins, ni chez le malade et sa mère. Ceci démontre que l'augmentation de l'activité glucolytique observée chez les sujets normaux après stimulation est due à la seule activité du cycle critique.

- Le stock de glucose 6 phosphate et de Fructose disphosphate sont diminués dans les plaquettes des malades atteints de syndrome de Wiscott-Aldrich (5). Enfin, l'étude des activités enzymatiques montre également une diminution de l'hexokinase plaquettaire (5).

En résumé, les anomalies biologiques essentielles retrouvées dans les plaquettes sont, d'une part, une diminution voire même une disparition du stock d'ADP et une réduction importante de la libération des nucléotides en présence de collagène ; d'autre part, un défaut de la glycolyse anaérobie et surtout aérobie, c'est-à-dire de l'activité du cycle citrique (- le shunt des hexoses monophosphates étant normal -) qui ne répond pas à la stimulation par l'adrénaline et le latex.

Cette anomalie du métabolisme intrinsèque des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich n'est pas dû à leur courte durée de vie ni à la thrombopénie. En effet les études précédentes faites sur des plaquettes de malades atteints de purpura thrombopénique idiopathique ont révélé des résultats normaux (5, 6).

Ces conclusions amènent les déductions suivantes :

- Le déficit du stockage des nucléotides intra-plaquettaires et de leur libération sont certainement la cause du déficit d'agrégation des plaquettes en présence de collagène, d'adrénaline ou d'autres agents agrégants. En effet, on sait que ces substances induisent l'agrégation par l'intermédiaire d'une libération d'ADP intra-plaquettaire qui réagit directement avec les plaquettes entraînant leur agrégation.

D'autre part, les réactions plaquettaires aux agents agrégants - (collagène, adrénaline, latex) - dont l'expression est une libération de métabolites divers et dont la conclusion est l'agrégation plaquettaire même, sont liées à des stimulations du métabolisme énergétique des cellules par les substances agrégantes. Le déficit du métabolisme énergétique qui vient d'être démontré rend donc bien compte de la thrombopathie du syndrome de Wiscott-Aldrich.

- Le problème qui se pose maintenant est de savoir si le défaut de réponse métabolique des plaquettes aux agents stimulants est dû à un trouble primaire du cycle de Krebs ou à un manque de régulation de celui-ci (5). Une expérience va fournir la réponse : en effet, l'iodacétate, inhibiteur puissant de la glycéraldehyde deshydrogénase stimule la glycolyse aérobie dans les mitochondries, sans entraîner de réaction de libération ni d'agrégation plaquettaire. Il permet donc de stimuler le cycle de Krebs directement. La production de $C0_2$ fournie à partir du glucose marqué en C_6, donc l'activité du cycle citrique, s'est révélée identique chez les malades et le témoin, quand on utilise cet agent stimulant chimique. Le cycle citrique fonctionne donc de manière normale mais il existe un défaut de régulation de cette voie métabolique qui est responsable du défaut de réponse aux stimulations biologiques.

La nature de ce ou de ces régulateurs est à rechercher.

On en est là encore à des hypothèses fondées sur des rapprochements entre les résultats d'études fonctionnelles, métaboliques et morphologiques.

Chez les sujets normaux, les agents agrégants des plaquettes tels collagène, adrénaline ou particules phagocytoses, induisent simultanément et conjointement à l'agrégation plaquettaire une réaction de libération des métabolites intra-cellulaires et une dégranulation du cytoplasme, en particulier, perte des lysosomes ou alpha-granules. Or, les mêmes agents entraînent une stimulation du cycle citrique qui manque dans les plaquettes de patients atteints de la maladie de Wiscott-Aldrich.

Les agents agrégants produisant à la fois et en même temps une dégranulation et une stimulation de la glycolyse aérobie par le cycle de Krebs, on peut en inférer que ce sont les lysosomes plaquettaires qui contiennent un ou plusieurs régulateurs physiologiques du cycle de Krebs (5). Dans le syndrome de Wiscott-Aldrich un défaut quantitatif ou qualitatif des lysosomes empêcherait la libération et l'action de ce régulateur sous l'effet des agents d'agrégation qui n'induisent donc pas la stimulation métabolique attendue. Or, l'étude morphologique des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich par la microscopie électronique montre la rareté des lysosomes intra-plaquettaires et des altérations morphologiques de ceux-ci (5).

Ainsi, les altérations fonctionnelles des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich apparaissent-elles liées à des altérations du métabolisme intrinsèque des plaquettes, elles-mêmes en rapport avec une anomalie ultra-structurale des plaquettes, le défaut en lysosome.

Il reste à montrer que la thrombopénie dont nous avons vu qu'elle est due à une destruction périphérique exagérée des plaquettes, est aussi à rapporter à un défaut ultra-structural.

Une accumulation de lipides dans le système réticulo-endothélial (rate, ganglions) de patients atteints du syndrome de Wiscott-Aldrich et la découverte en microscopie électronique de plaquettes phagocytées par les cellules du système réticulo-endothélial, dans la moelle des mêmes sujets, suggèrent que les plaquettes sont détruites de manière accrue par ce système réticulo-endothélial (4). Les cellules de celui-ci phagocyteraient les plaquettes reconnues par elles comme corps étrangers en raison d'un défaut intra-corpusculaire.

CONCLUSION

Au total, cette étude nous permet de conclure que le déficit plaquettaire dans le Syndrome de Wiscott-Aldrich présente deux aspects :

- une courte durée de vie des plaquettes d'où thrombopénie,

- un défaut de fonctionnement des plaquettes ; elles ne répondent pas aux agents agrégants. Or, l'agrégation des plaquettes entre elles et au collagène étant le support matériel et physiologique du clou hémostatique, l'absence ou la mauvaise qualité de cette réaction des plaquettes des sujets atteints de syndrome de Wiscott-Aldrich est responsable de la thrombopathie observée.

Ce défaut d'agrégation représente l'absence d'une réponse spécifique des plaquettes à une stimulation par des agents divers biologiques ou non. C'est dans la mise en jeu de cette réaction et dans ses modalités que nous avons cherché le défaut incriminé.

Le phénomène d'agrégation plaquettaire fait appel d'une part au pool nucléotidique de la cellule, d'autre part à son potentiel énergétique essentiellement fourni par le cycle citrique.

Les expériences étudiées avec les plaquettes de la Maladie de Wiscott-Aldrich en comparaison avec des plaquettes de sujets normaux, ont montré que ces 2 facteurs nécessaires à l'agrégation des plaquettes étaient en défaut : Défaut en effet de libération d'ADP en présence d'un agent agrégant

et défaut de glycolyse ou plutôt de réponse aux stimulations de cette voie métabolique. Les activités enzymatiques étant vérifiées et normales, il restait à invoquer un défaut de régulation du métabolisme glucidique. Pour étayer cette hypothèse on a cherché le support cellulaire structural de cette activité régulatrice. Or, l'anomalie ultra-structurale la plus frappante des plaquettes dans le syndrome de Wiscott-Aldrich étant la dégranulation cytoplasmique et en particulier l'absence de lysosomes, comme d'autre part, la réponse aux agents agrégants observable morphologiquement est une dégranulation alpha du cytoplasme, nous en concluons que c'est dans les lysosomes ou granules alpha que réside l'origine de la réponse métabolique des plaquettes aux agents agrégants.

Nous pouvons donc essayer d'expliquer ainsi les anomalies constatées dans le Syndrome de Wiscott-Aldrich. La cellule privée du support régulateur de ses activités métaboliques énergétiques est incapable de faire face aux stimulations et aux agressions : il s'ensuit une sorte de dégénérescence qui est observable par des modifications morphologiques et ultra-structurales : forme déchiquetée, petite taille, aspect inerte du cytoplasme. Reconnue comme cellule anormale par le système réticulo-endothélial, elle y est alors captée et phagocytée après un délai de vie plus court que des plaquettes normales.

oOo

Vu, le Président de Thèse :

Professeur P. MOZZICONACCI

Vu, le Doyen de la Faculté :

Professeur H. JEROME

Vu et Permis d'Imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET

- BIBLIOGRAPHIE -

- PREMIERE PARTIE -

1 - AARON, J. MARCUS M. D. -

New England Journal of Medecine 280 : 1. 213-1. 220, 1. 278-1. 284. 1. 330-1. 334.
May 29, June 5, 12. 1969.

2 - LUSCHER E. F. -

Platelets in haemostasis and thrombosis.
Brit. J. Haemat. 13 ; 1-9, 1967.

3 - MARCUS A. J. -

Hemostatic process. In Modern. Concepts in Hematology.
Edited by C. MENGEL, E. FREI, L. SULLIVAN and R. NACHMAN.
Chicago : Yearbook Publishers, 1969 (in press).

4 - HOVIG, T. ROWSELL, H. C. DODDS, W. J. JORGENSEN L., and MUSTARD J. F. -

Experimental hemostasis in normal dogs and dogs with congenital disorders of blood coagulation.
Blood 30 : 636-668. 1967.

5 - FRENCH J. E. MACFARLANS, R. G., and SANDERS, A. G. -

Structure of haemostatic plugs and experimental thrombi in small arteries.
Brit. J. Exper. Path. 45 : 467-474, 1964.

6 - JOHNSON, S. A. -

Platelets in hemostasis.
In Blood Clotting Enzymology. Edited by W. H. SEEGERS New-York : Academic Press 1967, Pp. 379-420.

7 - ASHFORD, T. P., and FREIMAN D. G. -

Role of endothelium in initial phases of thrombosis : electron microscopic study.
Am. J. Path. 50 : 257-273, 1967.

8 - MUSTARD J. F., et Al. -

Platelets, blood coagulation and thrombosis. In Physiology of Hemostasis and Thrombosis.
Edited by S. A. JOHNSON and W. H. SEEGERS.
Springfield, Illinois Thomas 1967 (American Lectures in Hematology)
Pp. 288-326.

9 - MUSTARD, J. F. and PACKHAM, M. A. -

Biochemistry of primary hemostasis. In Plenary Sessions Papers.
Edited by E. R. Jaffé New-York :
XII Congress International Society of Hematology. 1968, Pp. 306-314.

10 - MARCUS A. J. ZUCKER-FRANKLIN, D., SAFIER L. B., and ULLMAN H. -

L. Studies on human platelets granules and membranes.
J. Clin. Investigations 45 : 14-28, 1966.

11 - LUSCHER E. F. -

Report of Subcommittee on Current Concepts of Hemostasis.
Throm. et diath. haemorrh. Supp. 26 : 323-333, 1967.

12 - DAVEY M. G. and LUSCHER E. F. -

Release reactions of human platelets induced by thrombin and others agents.
Biochim. et biophys. acta 165 : 490-506, 1968.

13 - NACHMAN R. L. and FERRIS B. -

Studies on human platelet protease activity.
J. Clin. Investigation 47 : 2. 530-2. 540, 1968.

14 - MARCUS, A. J. and ZUCKER M. B. -

The physiology of Blood Platelets : Recent Biochimical, morphologic and clinical research.
New-York : Grune 1965.

15 - SPAET T. H. and ZUCKER M. B. -

Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine diphosphate.
Am. J. Physiol. 206 : 1. 267-1. 274, 1964.

16 - DEYKIN D., PRITZKER C.R., and SCOLNICK E.M. -

Plasma cofactors in adenosine diphosphate-induced aggregation of human platelets.
Nature (London) 208 : 296-298, 1965.

17 - SOLUM N.O. and STORMORKEN H. -

Influence of fibrinogen on aggregation of washed human blood platelets induced by adenosine diphosphate, thrombin, collagen, and adrenaline.
Scandinav. J. Clin. & Lab. Investigation 17 (Suppl. 84) : 170-182. 1965.

18 - HASLAM R.J. -

Mechanisms of blood platelet aggregation. In Physiology of Hemostasis and thrombosis. Edited by S.A. Johnson and W.H. Seegers. Springfield, Illinois : Thomas, 1967.
(American lectures in hematology) Pp. 88-112.

19 - HOROWITZ H.I. and PAPAYCANOU M.F. -

Release of nonsedimentable platelet factor 3 during coagulation.
J. Lab. & Clin. Med. 69 : 1.003-1.012, 1967.

20 - HOROWITZ H.I. and PAPAYOANOU M.F. -

Activation of platelet factor 3 by adenosine 5 diphosphate. Thromb. et diath.
Haemorrh. 19 : 18-28, 1968.

21 - HOUGIE C. -

Activation of platelets by plasma.
Brit. J. Haemat. 1 : 213-222, 1955.

22 - HELLEM A.J. -

Platelet adhesiveness.
Scandinav. J. Haemat. (Series haemat), 1 : 99-145, 1968.

23 - BORN, G.V.R. -

Platelet membrane and its functions. In Plenary Session papers.
Edited by E.R. JAFFE New-York :
XII Congress International Society of Hematology 1968 Pp. 95-101.

24 - SALZMAN, E.W., CHAMBERS D.A. and NERI L.L. -

Incorporation of labelled nucleotides and aggregation of human blood platelets.
Thromb. et diath. haemorrh. 15 : 52-68. 1966.

25 - CHAMBERS D. A., SALZMAN E. W. and NERI L. L. -

Platelet nucleotide metabolism and platelet aggregation. In Experimental Biology and Medicine. Vol. 3 Platelets in Haemostasis.
Edited by E. HAGEN, W. WECHSLER and ZILLIKEN, New-York :
Karger, 1968 Pp. 62-70.

26 - BORN G. V. R. -

Mecchanism of platelet aggregation and of its inhibition by adenosine derivatives.
Federation Proc. 261 115-117. 1967.

27 - ROZENBERG M. D. and HOLMSEN. -

H. Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. IV. Platelet aggregation response to exogenous A. T. P. and A. D. P.
Biochim. et biophys. acta 157 : 280-288, 1968.

28 - C'BRIEN, J. R. -

Changes in platelet membranes possibly associated with platelet stickiness.
Nature (London) 212 : 1. 057, 1966.

29 - HOLMSEN H. -

Adenine nucleotide metabolism in platelets and plasma. In Biochemistry of blood Platelets. Edited by E. KOWALSKI and S. NIEWIAROWSKI.
New-York :
Academic Press., 1967, Pp. 81-90.

30 - ZUCKER M. B. -

A. D. P. and collagen induced platelet aggregation in vivo and in vitro.
Thromb. et diath. haemorrh. Supp. 26 : 175-184, 1967.

31 - ARDLIE N. G., GLEW G., and SCHWARTZ C. J. -

Influence of catecholamines on nucleotide-induced platelet aggregation.
Nature (London) 212 : 415-417, 1966.

32 - MILLS D. C., and ROBERTS G. C. -

Effects of adrenaline on human blood platelets.
J. Physiol. 193 : 443-453, 1967.

33 - HIRSH J., GLYNN M. F., and MUSTARD J. F. -

Effect of platelet age on platelet adherence to collagen.
J. Clin. Investigation 47 : 466-473, 1968.

34 - BULL B. S. and ZUCKER, M. B. -

Changes in platelet volume produced by temperature, metabolic inhibitors, and aggregating agents.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 120 : 296-301, 1965.

35 - O'BRIEN J. R. -

Platelet stickiness.
Ann. Rev. Med. 17 : 275-290. 1966.

36 - Ireland D. M. -

Effect of thrombin on radioactive nucleotides of human washed platelets.
Biochem. J. 105 : 857-867, 1967.

37 - MUSTARD J. F. -

Hemostasis and Thrombosis.
Seminars in Hemat. 5 : 91-106, 1968.

38 - PACKHAM, M. A., NISHIZAWA E. E. and MUSTARD J. F. -

Response of Platelets to tissue injury. Biochem. Pharmacol. Supp. pp. 171-184, 1968.

39 - ZUCKER M. B. PERT J. H. and HILGARTNER M. W. -

Platelet Function in patient with thrombasthenia.
Blood 28 : 524-534. 1966.

40 - MITCHELL J. R. -

A Pathogenesis of thrombosis. In Plenary Session Papers Edited by E. R. Jeffé New-York :
XIIe Congress International Society of Hematology, 1968, Pp. 321-329.

41 - NACHMAN R. L., MARCUS A. J., and SAFIER L. B. -

Platelet thrombosthenin-subcellular localization and function.
J. Clin. Investigation 46 : 1. 380-1. 389, 1967.

42 - MACMILLAN D. C. -

Secondary clumping effect in human citrated platelet rich-plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline.
Nature (London) 211 : 140-144, 1966.

43 - MILLS D. C. B., ROBB I. A., and ROBERTS G. C. K. -

Release of nucleotides, 5-hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation.
J. Physiol. 195 : 715-729. 1968.

44 - SALZMANN E. W. -

Measurement of platelet adhesiveness : progress report.
Thromb. et diath. Haemorrh. Supp. 26 : 303-307, 1967.

45 - MELCHINGER D. and NEMERSON Y. -

Randomness of platelet adhesiveness with respect to their A. T. P., 0_2 consumption, and size.
J. Appl. Physiol. 22 : 197-200, 1967.

46 - ERICHSON KATZ and CINTRON

Blood.
Vol. 29 W03 1967.

47 - CONLEY C. L. -

Platelets in clot retraction In : Henry FORD Hospital Symposium on blood platelets.
Boston, Little, BROWN & Co., 1960, p. 437.

48 - HAYDON G. B. -

Electron microscopic observations of blood platelets and fibrin formation.
Arch. Path. 64 : 393. 1957.

49 - HUGHES J. and LAPIERRE Ch. M. -

Nouvelles recherches sur l'accolement des plaquettes aux fibres de collagène.
Thromb. Diath. Haemorrh. 11 : 327, 1964.

50 - WEISS P. -

Cell. Contact.
Int. Rev. Cytol. 7 : 391, 1958.

51 - RODMAN N. D. Jr. MASON R. G. and BRINKHOUS K. M. -

Some pathogenetic mechanisms of white thrombus formation : Agglutination and self destruction of the platelet.
Fed. Proc. 22 : 1, 356, 1963.

52 - HOVIG T. -

The ultrastructure of rabbit blood platelet aggregates.
Thromb. Diath. Haemorrh. 8 : 455, 1962.

53 - ERICHSON R. B., and CINTRON J. R. -

Ultrastructural observations of platelet adhesion reactions.
III Platelet-collagen interaction.
Submitted for publication.

54 - GLYNN M. F., MOVAT H. Z., MURPHY E. A., and MUSTARD J. F. -

Study of platelet adhesiveness and aggregation with latex particles.
J. Lab. Clin. Med. 65 : 179 - 1965.

55 - MOVAT H. Z., WEISER W. J., GLYNN M. F., and MUSTARD J. F. -

Platelet phagocytosis and aggregation.
J. Cell. Biol. 27 : 531. 1965.

56 - HOENIG E., and ERICHSON R. B. -

Ultrastructural observations of platelet adhesion reactions.
II. Platelet interaction with latex particles in vivo.
In preparation.

57 - CURTIS A. S. G. -

Cell contacts : some physical considerations.
Amer. Naturalist. 94 : 37, 1960.

58 - PETHICA B. A. -

The physical chemistry of cell adhesion.
Exp. Cell Res. Suppl. 8 : 123, 1961.

59 - HOVIG T. -

The effect of various enzymes on the ultrastructure, aggregation, and clot reaction ability of rabbits blood platelets.
Thromb. Diath. Haemorrh. 13 : 84, 1965.

60 - KARPATKIN S. -

Studies on human platelet glycolysis : effect of glucose, cyanide, insulin, citrate, and agglutination and contraction on platelet glycolysis.
J. Clin. Investigation 46 : 409-417, 1967.

61 - GORSTEIN F. CAROLL H. J., and PUSZKIN E. -

Electrolyte concentrations, potassium flux kinetics, and metabolic dependence of potassium transport in human platelets.
J. Lab. & Clin. Med. 70 : 938-950, 1967.

62 - COOLEY M. H. and COHEN P. -

Potassium transport in human blood platelets.
J. Lab. & Clin. Med. 70 : 69-79, 1967.

63 - MURER E. H., HELLEM A. J., and ROZENBERG M. L. -

Energy metabolism and platelets function.
Scandinav. J. Clin. & and Lab. Investigation 19 : 280-282, 1967.

64 - VAINER H. and WATTIAUX R. -

Glycogen synthetase activity in blood platelets.
Nature (London) 217 : 951 -, 1968.

65 - SCOTT R. B. -

Activation of glycogen phosphorylase in blood platelets.
Blood 30 : 321-330, 1967.

66 - WARSHEW A. L., LASTER L. and SHULMAN N. R. -

Stimulation by thrombin of glucose oxydation in human platelets.
J. Clin. Investigation 45 : 1. 923-1. 934, 1966.

67 - LODER P. B. HIRSH J. and De GRUCHY G. C. -

Effect of collagen on platelet glycolysis and nucleotide metabolism.
Brit. J. Haemat. 14 : 563-573, 1968.

68 - KARPATKIN S. and LANGER R. M. -

Biochemical energetics of simulated platelet plug formation : effect of thrombin, adenosine diphosphate and epinephrine on intra and extracellular adenine nucleotide kinetics.
J. Clin. Investigation 47 : 2. 158-2. 168. 1968.

69 - DOERY J. C. G., HIRSH J. LODER P. B., and De GRUCHY G. C. -

Distribution of platelet hexokinase and effect of collagen.
Nature (London) 216 : 1. 317. 1967.

70 - PUSZKIN E., and JERUSHALMY Z. -

Effect of connective tissus and collagen on platelet lactate production : role of acid mucopolysaccharides.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 129 : 346-351, 1968.

71 - NACHMAN R. L. -

Platelet proteine.
Seminars in Hemat. 5 : 18-31, 1968.

72 - DAVEY M. G. and LUSCHER E. F. -

Platelet proteins. In Biochemistry of blood platelets. Edited by E. Kowalsky and S. Niewiarowski. New-York. :
Academic Press. 1967, Pp. 9-22.

73 - HOROWITZ H. I., and FUJIMOTO M. M. -

Association of factors XI and factors XII with blood platelets.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 119 : 487-492, 1965.

74 - KIESSELBACH T. H., and WAGNER R. H. -

Fibrin-stabilizing factor thrombin-labile platelet protein.
Am. J. Physiol. 211 : 1. 472-1. 476, 1966.

75 - NIEWIAROWSKI S., FARBISZEWSKI R. and POPLAWSKI A. -

Neutralisation of antithrombin VI (fibrinogen breakdown products) with platelet anti-heparin factor (platelet factor 4).
Thromb. et diath. Haemorrh. 14 : 490-499. 1965.

76 - YOUSSEF A., and BARKHAN P. -

Release of platelet factor 4 by adenosine diphosphate and other platelet aggregating agents.
Brit. M. J. 1 : 176, 1968.

77 - WARSHAW A. L., LASTER L. and SHULMAN N. R. -

Protein synthesis by human platelets.
J. Biol. Chem. 242 : 2. 094-2. 097, 1967.

78 - BOOYSE F. M. and RAFELSON M. E. Jr. -

Studies on human platelets I. Synthesis of platelet protein in cell-free system.
Biochim. et Biophys. Acta. 166 : 689-697, 1968.

79 - ZIEVE P. D. and SOLOMON H. M. -

Uptake of amino acids by human platelet.
Am. J. Physiol. 214 : 58-61. 1968.

80 - MARCUS A. J., ULLMAN H. L., SAFIER L. B. and BELLARD H. S. -

Platelet phosphatides : their fatty acid and aldehyde composition and activity in different clotting systems.
J. Clin. Investigation 41 : 2. 198-2. 212, 1962.

81 - MARCUS A. J., ULLMAN H. L. and SAFIER L. B. -

Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets.
J. Lipid Research. 10 : 108-114, 1969.

82 - DEYKIN D., and DESSER R. K. -

Incorporation of acetate and palmitate into lipids by human platelets.
J. Clin. Investigation 47 : 1. 590-1. 602, 1968.

83 - HENNES A. R., AWAI K., HAMMARSTRAND K. and DUBOFF G. -

Carbon 14 in carboxyl carbon of fatty acids formed by platelets from normal and diabetic subjects.
Nature (London) 210 : 839-841, 1966.

84 - MAJERUS P. W., SMITH M. B. and CLAMON G. H. -

Lipid metabolism in human platelets. I. Evidence for complets fatty acid synthesizing system.
J. Clin. Investigation 48 : 156-164, 1969.

85 - PLETSCHER A. -

Metabolism. transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets.
Brit. J. Pharmacol. 32 : 1-16, 1968.

86 - HOLMSEN H. and DAY H. J. -

Thrombin-induced platelet release reaction and platelet lysosomes.
Nature (London) 219 : 760, 1968.

o0o

- DEUXIEME PARTIE -

1 - CRESCELLI C., WILLIAMSON C. -

Le Syndrome de Wiscott-Aldrich : données récentes à propos de 4 observations.
Journées parisiennes de Pédiatrie 1970 p. 155.

2 - COOPER M. D., CHASE H. P., LOWMAN J. T., KWITW and COOD R. S. -

Wiscott-Aldrich syndrome (18 cas).
American Journal of Medicine 1968. 44. 499.

3 - WISCOTT-ALDRICH SYNDROME. -

A genetically determined cellular immunologic deficiency : clinical and laboratory responses to therapy with transfert factor.
Proceeding of the national academy of sciences 67, 2, 821-828, oct. 1970.

4 - (W. A. SYNDROME). -

Qualitative platelets defects and short platelet survival.
Procceding of the 4 th. Platelet conference Oak Ridge National Mab. 1969. p. 44.

5 - KURAMOTI A., STENIES M. and BALDINI M. G. -

Lack of platelet response to stimulation in W. A. syndrome.
New England Journal of Medicine 1970. 282-475.

6 - BALDINI M. et Coll. -

Metabolic platelet defect in Wiscott-Aldrich syndrome.
Pediatric research. 1969, 3, 377.

7 - PEARSON M., SHULMAN N. R., OSKI F. A. -

Platelet survival in Wiscott-Aldrich syndrome.
Journal of Pediatry - 1966-68-754.

o0o